

# **Linken mellom uttrykket av CYP3A4 og biotilgjengelighet av atorvastatin ved gastrisk bypass**

**Tone Oftedahl**



Mastergradsoppgave i farmasi

Farmasøytisk Institutt

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

**UNIVERSITETET I OSLO**

Mai 2009

# Linken mellom uttrykket av CYP3A4 og biotilgjengelighet av atorvastatin ved gastrisk bypass

Tone Oftedahl



Mastergradsoppgave i farmasi

Farmasøytisk Institutt

Avdeling for farmasøytisk biovitenskap

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2009

Veiledere:

Professor Hege Christensen, Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk Institutt  
Professor Anders Åsberg, Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk Institutt  
Stipendiat Ine B. Skottheim, Avdeling for farmasøytisk biovitenskap, Farmasøytisk Institutt

## FORORD

*Denne oppgaven er utført ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap under veiledning av professor Hege Christensen, doktorgradsstipendiat Ine B. Skottheim og professor Anders Åsberg. Arbeidet ble påbegynt juni 2008 og avsluttet mai 2009.*

*Først og fremst vil jeg rette en spesiell takk til Hege Christensen for din engasjerende veiledning. Du har vært til uvurderlig hjelp og støtte, og ikke minst oppmuntring under hele hovedfaget. Takk for at du alltid er så positiv.*

*Jeg vil også takke Ine B. Skottheim for din gode hjelp og diskusjon underveis, og Anders Åsberg for din konstruktive kritikk og faglige bidrag.*

*En stor, stor takk rettes også til Siri Johannesen for super opplæring, hjelp og gode råd på lab. Takk for ditt gledelige humør og for at du tålmodig har delt din kunnskap.*

*Jeg vil i tillegg takke alle andre ansatte ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap for gode råd og hyggelig samvær. Til slutt vil jeg gjerne takke venner og familie for deres støtte underveis, og en spesiell takk til Jone, som fremdeles vil gifte seg med meg etter dette året.*

*Blindern 13. mai, 2009*

*Tone Oftedahl*

# INNHALDSFORTEGNELSE

<b>1. FORKORTELSER .....</b>	<b>1</b>
<b>2. SAMMENDRAG.....</b>	<b>2</b>
<b>3. INTRODUKSJON.....</b>	<b>4</b>
3.1 Biotilgjengelighet av orale legemidler .....	4
3.2 Cytokrom P450 monooxygenase systemet.....	5
3.2.1 CYP gen familien.....	7
3.2.2 CYP3A underfamilien .....	9
3.2.3 CYP3A4 og CYP3A5 .....	10
3.3 Atorvastatin .....	11
3.3.1 Generell karakteristikk.....	11
3.3.2 Farmakokinetikk .....	11
3.4 Overvektskirurgi.....	14
3.5 Analysestudier av proteinuttrykk i humane biopsier.....	17
3.5.1 Cellefraksjonering.....	17
3.5.2 Måling av CYP3A4, CYP3A5 og villin ved Western blott.....	20
3.6 Farmakokinetikkstudier .....	21
3.7 Hensikten med oppgaven.....	22
<b>4. MATERIALE .....</b>	<b>23</b>
<b>5. METODE .....</b>	<b>24</b>
5.1 Pasientpopulasjon .....	24
5.2 Analysemetoder .....	25
5.2.1 Løsning til cellefraksjonering .....	25
5.2.2 Prosedyre for cellefraksjonering.....	25

5.2.3	Løsning til Western blott .....	26
5.2.4	Måling av CYP3A4, CYP3A5 og villin ved Western blott.....	26
5.2.5	Validering av metoden.....	30
5.2.6	Prosedyre for måling av totalprotein .....	31
<b>6.</b>	<b>RESULTATER.....</b>	<b>32</b>
6.1	Metodeutvikling.....	32
6.1.1	Metodeutvikling cellefraksjonering.....	32
6.1.2	Metodeutvikling kvantifisering av proteiner .....	33
6.1.3	Validering av metoden.....	38
6.2	Resultater pasienter.....	38
6.2.1	CYP3A4.....	38
6.2.2	Villin .....	40
6.2.3	Totalprotein målinger .....	41
6.2.4	Farmakokinetiske data .....	42
<b>7.</b>	<b>DISKUSJON .....</b>	<b>44</b>
7.1	Overveielse av metode.....	44
7.1.1	Cellefraksjonering.....	44
7.1.2	Kvantifisering av proteiner .....	46
7.1.3	Fremtidige betraktninger for metode .....	47
7.2	Kvantitative resultater av CYP3A4 og villin og link til farmakokinetisk profil til pasientene.....	47
<b>8.</b>	<b>KONKLUSJON.....</b>	<b>51</b>
<b>9.</b>	<b>KILDELISTE .....</b>	<b>52</b>
<b>10.</b>	<b>VEDLEGG.....</b>	<b>57</b>

# 1. FORKORTELSER

ABC	ATP bindende kassett
ABC B1	ATP bindende kassett type B1
AUC	Areal under plasma-konsentrasjons-tidskurven
BMI	Body mass indeks
BSA	Bovint serumalbumin
CYP	Cytokrom P450
DPYD	Dihydropyrimidindehydrogenase
ER	Endoplasmatisk retikulum
G	Gravity
Gel	Doc gel documentation
GI	Gastrointestinal
HMG-CoA	3-hydroksy-3-metyl glutaryl coenzym A
LDL	Low-density lipoprotein
LMH	Legemiddel
MCT	H <sup>+</sup> -monokarboksylsyre transportør
MDR1	Multidrug resistant gen type 1
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
OATP1B1	Organisk anion transportør 1B1
OATP2	Organisk anion transportør 1B1
OATP-C	Organisk anion transportør 1B1
OATP2B1	Organisk anion transportør 2B1
PBS	Fosfat buffret Saline (Phosphate buffered saline)
Pgp	P-glycoprotein
PK3	Farmakokinetikk 3
Rpm	Revolutions per minute
SDS	Natrium dodekyl-sulfat (sodium dodecyl sulfat)
SLC	Solute carrier
TBS	Tris-bufret saline-løsning
TP	Totalprotein
T-TBS	Tris-tween-bufret saline-løsning
VLDL	Very low density lipoprotein
WHO	World health organization

## 2. SAMMENDRAG

**Bakgrunn:** Gastrisk bypass er en prosedyre innen overvektskirurgi hvor deler av magesekk og tarm blir forbikoblet slik at evnen til absorpsjon av næring blir redusert. Denne fysiologiske endringen kan påvirke biotilgjengeligheten av legemidler. Atorvastatin er et kolesterolsenkende legemiddel forskrevet til behandling av hyperkolesterolemi. Legemiddelet har en begrenset biotilgjengelighet (12 %) som følge av omfattende CYP3A4 og CYP3A5 metabolisme. I tillegg er atorvastatin et substrat for P-glykoprotein og OATP1B1 transport.

**Mål:** Denne hovedfagsoppgaven er en del av et større samarbeidsprosjekt med Senter for sykelig overvekt ved sykehuset i Vestfold. Det overordnede målet for studien var å undersøke hvordan overvektskirurgi påvirker farmakokinetikken til atorvastatin. Målet for denne hovedoppgaven var å utvikle metoder for homogenisering av pasientbiopsier samlet fra mage, lever og ulike deler av tynntarm, og kvantifisering av CYP3A4 og CYP3A5 i disse biopsiene. Deretter skulle en mulig korrelasjon undersøkes mellom proteinuttrykket av CYP3A4 og CYP3A5 i biopsiene og den systemiske eksponeringen av atorvastatin i de samme pasientene.

**Metode:** Homogenater fra biopsiene ble laget med Precellys 24 og mikrosomer ble isolert etter sentrifugering ved 108 000 g i 1 time. Pelleten ble reløst i sukrosebuffer og preparert for Western blotting. Et immunoanalytisk dot-blott ble utarbeidet ved bruk av nitrocellulosemembran og Bio-Dot mikrofiltrasjonsapparat, og proteinuttrykket av CYP3A4 og CYP3A5 ble kvantifisert ved bruk av Syngene fra GeneTools. Villin, et cytoskeletal protein spesifikt for enterocytter, ble brukt til å normalisere mengden enzymer i biopsiene fra magesekk og tynntarm, og mengden CYP-enzym ble relatert til estimert totalprotein for hver biopsi.

**Resultater:** Validering av metoden for kvantifisering av CYP3A4 og CYP3A5-enzym i biopsier fra lever og ulike deler av gastrointestinalesystemet, viste tilfredsstillende interdag og intradag presisjon. Kvantitative resultater for CYP3A4 i biopsiene viste interindividuell variasjon, men det var antydning til en korrelasjon til

resultatene fra de farmakokinetiske studiene utført på pasientene før og etter operasjonen. Pasienter med generelt lavt uttrykk av CYP3A4 i tarm, hadde i utgangspunktet en høy  $AUC_{(0-8)}$ , som ble betraktelig redusert ved gastrisk bypass. Pasienter med høyt uttrykk av CYP3A4 i tarm, hadde derimot en lav  $AUC_{(0-8)}$ , som økte etter gastrisk bypass.

**Konklusjon:** Det ble utviklet metoder for homogenisering av biopsier fra magesekk, tarm og lever, og kvantifisering av CYP3A4 og CYP3A5 i disse biopsiene, ved bruk av Western blott. Mengder CYP3A4 ble kvantifisert, og resultatene tydet på at det var en sammenheng mellom uttrykket av CYP3A4 og endringer i den farmakokinetiske profilen av atorvastatin etter en gastrisk bypass operasjon.



### 3. INTRODUKSJON

#### 3.1 Biotilgjengelighet av orale legemidler

Gastrointestinal (GI) trakten har to hovedoppgaver; sørge for absorpsjon av næringsstoffer og samtidig å beskytte kroppen ved å hindre opptak av ”fremmede” substanser (Chan, Lowes et al. 2004). Biotilgjengelighet er en farmakokinetisk parameter som beskriver hvor stor andel av et gitt legemiddel som når det systemiske kretsløp, og den avhenger av absorpsjon, og blir begrenset av first pass metabolisme og efflux-transport i lever og tarm. Absorpsjon fra GI-trakten styres av faktorer som overflateareal, blodtilførsel til absorpsjonsstedet, legemiddelets fysiske egenskaper og konsentrasjonen av legemiddelet på absorpsjonsstedet (Goodman, Gilman et al. 2006). Legemidler absorberes fra både magesekk og tarm. Største delen av absorpsjonen foregår i tynntarmen, da den har et høyt antall villi og mikrovilli, som gir et stort absorpsjonsareal ( $300 \text{ m}^2$ ) (Widmaier, Raff et al. 2004). Legemidler på uionisert eller lipofil form krysser det intestinale epitelet paracellulært via passiv diffusjon over plasmamembranen. Hydrofile og ioniserte legemidler blir transportert transcellulært via spesifikke transportører (Chan, Lowes et al. 2004). Det finnes 2 hovedfamilier av transportører involvert i absorpsjon, distribusjon og ekskresjon av legemidler: solute carrier (SLC) og ATP bindene kassett (ABC). SLC superfamilien inkluderer transportører for blant annet organiske anioner og kationer. Organisk anion transportør 1B1 (OATP1B1), også kjent som OATP2 og OATP-C (Ayrton and Morgan 2008; Zheng, Huang et al. 2009), er en influx-transportør uttrykket i hepatocytene som driver aktivt opptak av blant annet 3-hydroksy-3-metyl glutaryl coenzym (HMG-CoA) reduktasehemmere. ABC-transportører er en stor gruppe transportører distribuert i blant annet lever, nyrer, tynntarm og blod-hjerne-barrieren. De fleste ABC transportørene er primært aktive transportører, avhengig av ATP hydrolyse for å kunne pumpe sine substrater mot en konsentrasjonsgradient over plasmamembraner. Flere transportører tilhører denne familien, men den mest kjente er P-glycoprotein (P-gp) også kjent som ABCB1 eller multidrug resistance gene (MDR1) (Goodman, Gilman et al. 2006). P-gp er en efflux-transportør uttrykket på

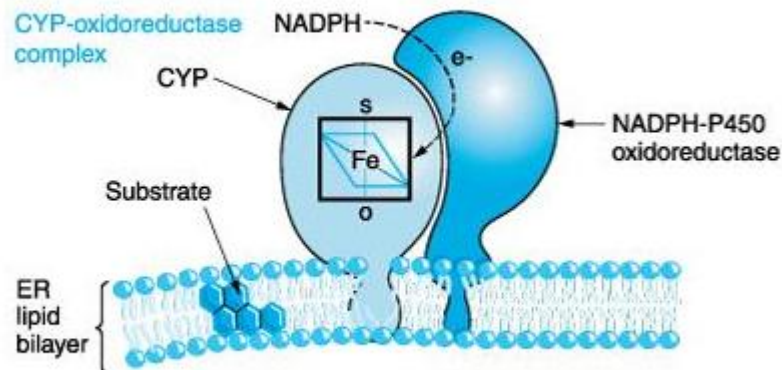
den apikale overflaten av epitelceller i ileum og kolon, og gradvis mindre i jejunum og duodenum mot magesekken. P-gp pumper legemidler ut av celler, og begrenser slik absorpsjonen i tarm. I lever og nyrene bidrar P-gp til ekskresjon av legemidler til galle og urin, og i blod-hjerne-barrieren former P-gp en funksjonell barriere som hindrer farmakologiske agenter tilgang til hjernen. (Goodman, Gilman et al. 2006; Takano, Yumoto et al. 2006).

For at legemidler og andre xenobiotika skal kunne elimineres fra kroppen, må de ofte omdannes til mer hydrofile metabolitter. Dette oppnås ved en rekke biotransformasjoner, klassifisert som fase 1 eller fase 2 metabolisme. I fase 1 reaksjoner får legemiddelet endret en funksjonell gruppe ved oksidasjon, hydroksylering, dealkylering, deaminering eller hydrolyse. Dette fører som regel til at legemiddelet mister sin effekt, men noen legemidler avhenger av metabolisme for å utøve sin effekt via aktive metabolitter (såkalte prodrugs). Fase 2 reaksjoner innebærer at et legemiddel eller en metabolitt, blir konjugert med polare grupper som for eksempel glukuronsyre, sulfat, aminosyrer eller acetat (Rang 2003; Goodman, Gilman et al. 2006). Leveren var tidligere ansett som hovedorganet i first pass metabolisme, ettersom legemidler som blir absorbert fra magesekk og tarm, må gjennomgå hepatisk metabolisme før de når det systemiske kretsløp. De siste årene er det blitt mer fokus på de metaboliserende enzymene i tynntarm som en viktig del av first pass metabolisme, og flere nyere studier understreker deres rolle i biotilgjengeligheten av legemidler (Lindell, Karlsson et al. 2003; Pang 2003; von Richter, Burk et al. 2004).

### 3.2 Cytokrom P450 monooxygenase systemet

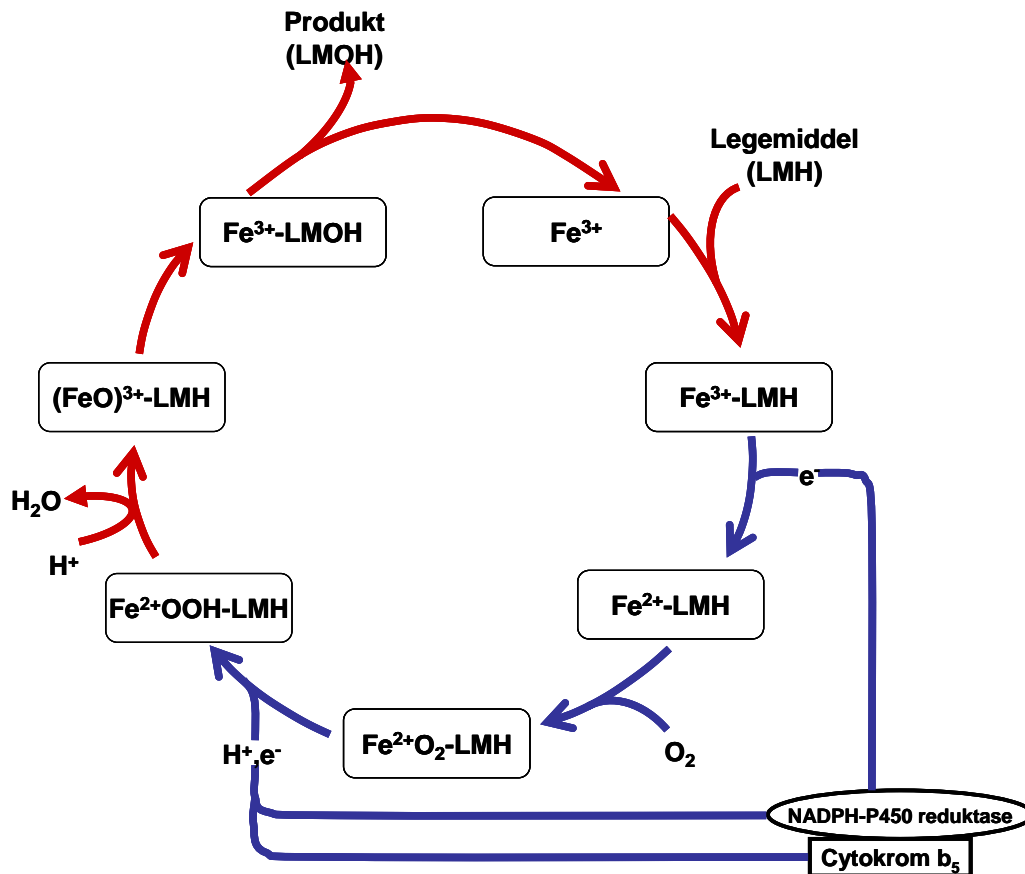
Cytokrom P450 monooxygenase (CYP) systemet består av en superfamilie av enzymer som via fase 1 reaksjoner metaboliserer xenobiotika (legemidler og andre kjemiske substanser) og endogene substanser (steroider, lipider og vitaminer) (Nebert and Russell 2002). I mennesker kan omtrent 80 % av oksidativ metabolisme og nesten 50 % av eliminasjonen av vanlige legemidler tilskrives en eller flere av de

forskjellige P450 enzymene (Wilkinson 2005). CYP-enzymene er heme-thiolat proteiner inkorporert i fosfolipid-bilaget i glatt endoplasmatisk retikulum (ER) (Figur 1) (Goodman, Gilman et al. 2006).



**Figur 1:** Cytochrome P450 enzymer (CYP) er inkorporert i fosfolipid-bilaget i endoplasmatisk retikulum (ER), tett assosiert til NADPH-cytokrom-P450-reduktase enzymet. De fleste enzymene er lokalisert på cytosol-siden av ER. Hydrofobe substrater (for eksempel legemidler), ligger løst i membranen og er utsatt for metabolisme (Goodman, Gilman et al. 2006).

CYP-enzymene forbruker molekulært oksygen ( $O_2$ ), og  $H^+$  fra redusert nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH), via NADPH-cytokrom-P450-reduktase eller cytokrom  $b_5$ , til å oksidere substrater. Det er omtrent ti CYP-enzymene assosiert til hvert NADPH-cytokrom-P450-reduktase enzym. Figur 2 viser en skjematisk oversikt over den flertrinnede oksidasjonsreaksjonen. Legemiddelet (LMH) reagerer med oksidert form av CYP-enzymet ( $Fe^{3+}$ ) og danner et kompleks ( $LMH-Fe^{3+}$ ). Cytokrom P450 reduktase overfører et elektron fra NADPH til komplekset slik at det blir redusert ( $LMH-Fe^{2+}$ ). Det nå reduserte substrat-enzym-komplekset reagerer med molekulært oksygen ( $O_2$ ), og et nytt elektron doneres fra NADPH via reduktase-enzymet samt 2 protoner. Til slutt blir et atom frigitt fra oksygenet som  $H_2O$ , og det andre oksygenatomet overføres til substratet samtidig som det oksiderte CYP-enzymet blir regenerert (Figur 2) (Goodman, Gilman et al. 1996).

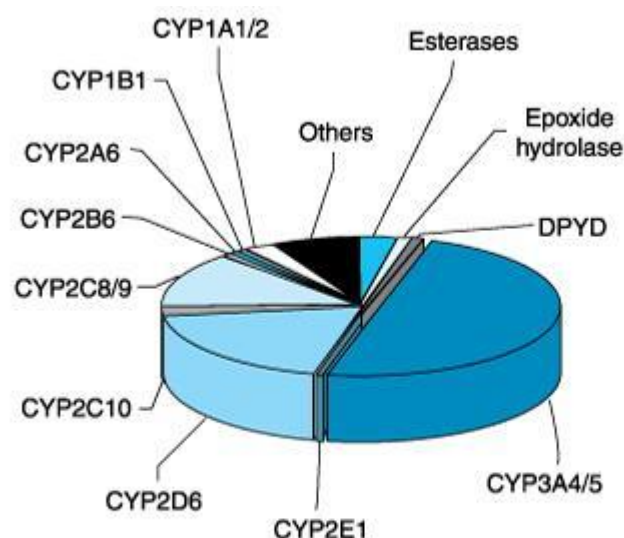


**Figur 2:** Oksidasjonszyklus katalysert av Cytokrom P450-enzymet. Legemiddelet (LMH) danner et kompleks med oksidert form av CYP-enzymet ( $\text{Fe}^{3+}$ ), og får et elektron overført fra nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) via NADPH reduktase eller cytokrom  $\text{b}_5$ . Det nå reduserte substrat-enzym-komplekset ( $\text{LMH-Fe}^{3+}$ ) reagerer med molekylært oksygen ( $\text{O}_2$ ), og et nytt elektron doneres fra NADPH via reduktase-enzymet samt 2 protoner. Komplekset dekomponerer til vann og det andre oksygenatomet overføres til substratet samtidig som det oksiderte CYP enzymet blir regenerert (Figur 2) Modifisert figur fra (Goodman, Gilman et al. 1996).

### 3.2.1 CYP gen familien

Rundt 57 aktive gen og 58 pseudogen for CYP familien er blitt identifisert i mennesket (Rodriguez-Antona and Ingelman-Sundberg 2006). CYP-enzymene er klassifisert i familier basert på likheter i aminosyre sekvens. Medlemmer av en gitt gen familie har  $> 40\%$  aminosyre likhet. En gen familie med CYP-enzymene er videre delt inn i underfamilier hvor  $> 55\%$  av aminosyre-sekvensene er identiske (Goodman, Gilman et al. 1996). CYP-enzymene er navngitt med CYP som rot

etterfulgt av et nummer som henviser til familie, en bokstav som viser til underfamilie og til slutt et nytt nummer som viser til CYP-isoenzym (Goodman, Gilman et al. 2006). Cytokrom 1, 2 og 3 (CYP1, CYP2 og CYP3), koder for enzymfamiliene involvert i majoriteten av biotransformasjon av legemidler. De andre CYP-familiene er mer viktige for metabolisme av endogene substanser (Goodman, Gilman et al. 1996). Metabolismen av legemidler via CYP-enzymene foregår hovedsakelig i lever, men enzymene er også uttrykt i mukosa i tynntarmen, i lungene, nyrene, hjernen, mukosa i nesen og i huden (Paine, Hart et al. 2006). Mukosa i tynntarmen er antatt å være det viktigste ekstrahepatiske vevet i forhold til metabolisme av orale legemidler (Lin and Lu 2001). Det er stor individuell variasjon i aktiviteten og uttrykk av CYP-enzym, og denne variasjonen kan føre til interindividuell variasjon i farmakologisk og toksikologisk effekt av legemidler (Guengerich and Shimada 1991; Shimada, Yamazaki et al. 1994). Denne store interindividuelle variabiliteten ble påvist i en omfattende undersøkelse utført av Shimada et al. på lever mikrosomer fra 30 japanere og 30 kaukasere. Studien viste en variasjon i enzym-uttrykk på 5 ganger for CYP3A4 og CYP2C, 12 ganger for CYP2E1, 20 ganger for CYP1A2 og mer enn 50 ganger for CYP2A6, CYP2B6 og CYP2D6 (1994). Figur 3 viser et kakediagram hvor hvert kakestykke representerer estimert prosentandel av legemidler metabolisert av fase 1 enzymer.



**Figur 3:** Kakediagrammet viser fraksjonen av legemidler metabolisert av ulike fase 1 enzymer. DPYD står for dihydropyrimidindehydrogenase (Goodman, Gilman et al. 2006).

### 3.2.2 CYP3A underfamilien

CYP3A underfamilien er antatt å være den viktigste andelen av legemiddel-metaboliserende enzymer (Wilkinson 2005), og utgjør ca. 80 % av totalt CYP innhold i tarm og ca. 30 % av totalt CYP-innhold i lever, hvor for øvrig største andel av CYP-enzymene befinner seg. (Shimada, Yamazaki et al. 1994; Paine, Hart et al. 2006). Enzymene i denne underfamilien har et stort aktivt sete som tillater binding av mange strukturelt forskjellige substrater (Guengerich 1999). På grunn av denne metabolske allsidigheten, er CYP3A ofte involvert i interaksjoner mellom legemidler. Legemiddelinteraksjoner kan redusere aktiviteten til CYP3A gjennom hemming, men aktiviteten kan også moduleres på transkripsjonsnivå (induksjon) både av legemidler og en rekke miljøfaktorer. Det finnes 4 CYP3A isoenzymer, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 og CYP3A43. CYP3A7 er dominant i fosterlivet, og avtar med alderen. Nyere studier har likevel funnet høye nivåer av CYP3A7 hos voksne (Daly 2006). CYP3A43 er kun funnet i lave nivåer, og dens betydning for metabolisme av legemidler er ukjent (Cauffiez, Lo-Guidice et al. 2004). CYP3A4 er det mest

dominante CYP3A enzymet i tynntarm og lever, hos voksne. CYP3A5 finnes også i tarm og lever, men enzymet utviser polymorfisme, og det er store interindividuelle forskjeller på mengde CYP3A5 uttrykket (Wrighton, Brian et al. 1990; Paine, Khalighi et al. 1997).

### 3.2.3 CYP3A4 og CYP3A5

CYP3A4 er den mest uttrykte isoformen av CYP-enzymet i voksne, og det er også denne isoformen som står bak majoriteten av CYP-mediert legemiddelmetabolisme. Flere alleler av CYP3A4 er funnet, men det er ennå ikke avdekket et "null" allele (Lamba, Lin et al. 2002). CYP3A5 er den best studerte av de mindre uttrykte CYP3A-isoformene. CYP3A5 utviser polymorfisme, og kun 20 % av voksne mennesker har CYP3A5 isoformen uttrykket i lever (Lamba, Lin et al. 2002; Daly 2006). I kontrast til CYP3A4 i lever og tynntarm, er CYP3A5 den mest dominante isoformen i magesekk og øsofagus (Lechevrel, Casson et al. 1999). Ulike CYP3A5 alleler gir opphav til varierende uttrykk og aktivitet av enzymet. CYP3A5\*3 er det vanligste allelet, og dette er assosiert med fravær av hepatisk CYP3A5 uttrykk. CYP3A5\*1 er en mer sjelden variant, og uttrykk av minst et av dette allelet er forbundet med et relativt høy metabolsk aktivitet av CYP3A5 (Haufron, Mourad et al. 2004; Daly 2006). CYP3A4 og CYP3A5 har overlappende substratspesifisitet på grunn av strukturell likhet (84 % av aminosyresekvensen) og det er derfor vanskelig å skille det relative bidraget til metabolisme fra hvert av enzymene (Wrighton and Stevens 1992; Lamba, Lin et al. 2002; Patki, Von Moltke et al. 2003). Flere studier er utført for å undersøke betydningen av CYP3A5, men resultatene er ikke konsistente. En svensk studie fra 2003 viser ingen signifikant betydning av CYP3A5 på metabolismen av legemidler, mens en amerikansk studie fra 2007, viste at CYP3A5 metabolisme kan ha klinisk betydning, men det avhenger av substrat og individuelt uttrykk av CYP3A5 (Westlind-Johnsson, Malmebo et al.; Isoherranen, Ludington et al.). CYP3A4 anses som hovedaktøren bak metabolismen av substrater som metaboliseres av både CYP3A4 og CYP3A5, men ettersom det ekstrahepatiske uttrykket av CYP3A5 er relativt høyt for individer med et eller to CYP3A5\*1 alleler, og det ekstrahepatiske uttrykket av CYP3A4 er generelt lavt i forhold til i lever, er det

mulig at CYP3A5 genotypen er viktig for first pass metabolismen som foregår i tarm (Lin, Dowling et al. 2002; Daly 2006).

### 3.3 Atorvastatin

#### 3.3.1 Generell karakteristikk

Statiner er i dag førstevalg for behandling av hyperkolesterolemi. De er svært effektive og godt tolerert (Guyton 2006). Flere studier viser at statiner senker progresjonen av aterosklerose og reduserer sykелighet og dødelighet assosiert med kardiovaskulære komplikasjoner (Grodos and Tonglet 1994; Sever, Dahlof et al. 2003; Costa, Borges et al. 2006). Legemidlene som tilhører statin-gruppen er kompetitive hemmere av HMG-CoA reduktase, et enzym som katalyserer konverteringen av HMG-CoA til mevalonat, et hastighetsbegrensende trinn tidlig i kolesterolsyntesen. Atorvastatin er et potent og syntetisk 2.generasjons statin (Lennernas 2003; Goodman, Gilman et al. 2006). Legemiddelet reduserer totalkolesterol, low-density lipoprotein (LDL), apolipoprotein B og kan i høyere doser redusere triglyserider forårsaket av forhøyede nivåer av very low density lipoprotein (VLDL) (Ginsberg 1998). Atorvastatin er en av de mest brukte HMG-CoA reduktase hemmerne i verden (Backman, Luurila et al. 2005), og ifølge tall fra Reseptregisteret er det omtrent 60 000 brukere av atorvastatin i Norge i dag (2008).

#### 3.3.2 Farmakokinetikk

##### *Absorpsjon og Distribusjon*

Atorvastatin gis i orale doser på 10-80 mg/dag, i form av kalsium saltet av den aktive hydroksysyren (Lennernas 2003). Syren er et overflateaktivt molekyl, med både en lipofil og en hydrofil del. Disse fysiske-kjemiske egenskapene gir legemiddelet høy løselighet og permeabilitet slik at det blir nesten fullstendig absorbert ved oral administrasjon (Lindahl, Persson et al. 1999; Lennernas 2003). *In vivo* blir syren av atorvastatin konvertert til lakton, en inaktiv form av atorvastatin, og de to formene inngår en likevekt (Figur 4). Interkonverteringen mellom syre og lakton skjer kontinuerlig, og både syre- og laktonformen har omtrent samme areal under plasma

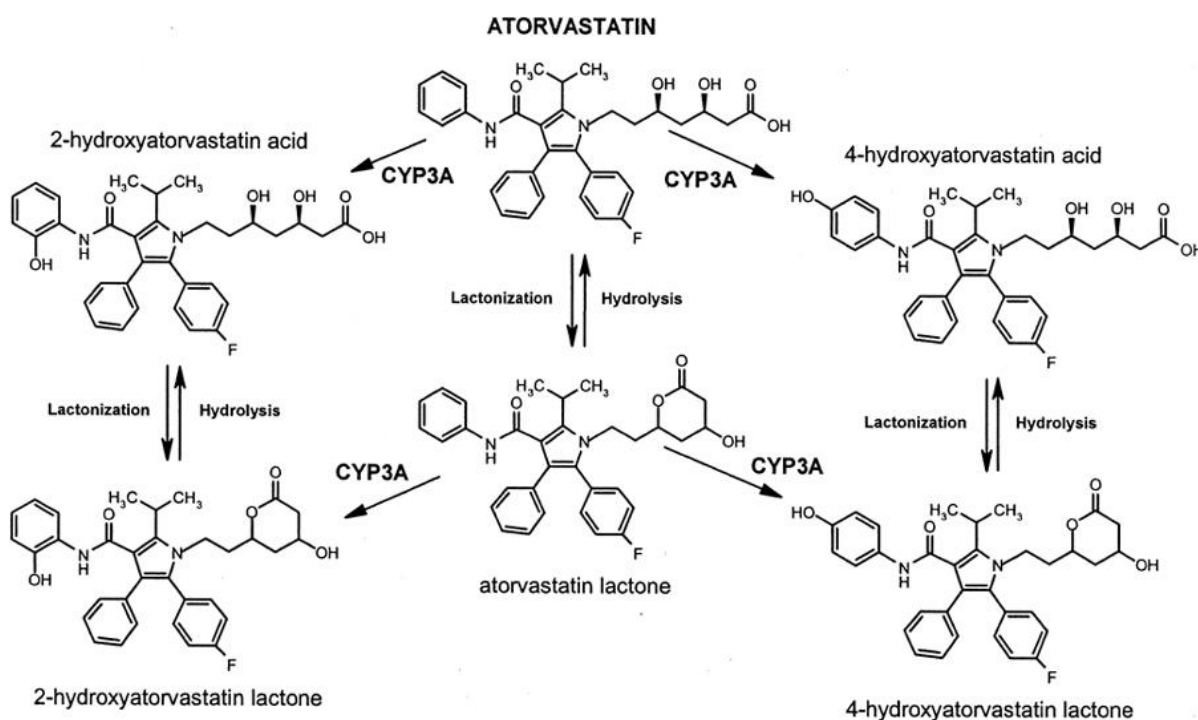


konsentrasjons-tidskurven (AUC) (Kearney, Crawford et al. 1993; Kantola, Kivisto et al. 1998). Forholdet mellom dose og respons er log-lineært, men plasmakonsentrasjonen av atorvastatin og metabolitter kan ikke korreleres direkte til den kolesterolsenkende effekten. HMG-CoA reduktase-aktiviteten er størst i lever, og derfor er det konsentrasjonen av legemiddelet i lever som relateres til den farmakologiske effekten (Stern, Yang et al. 2000). Absorpsjon av atorvastatin foregår både via passiv diffusjon og mediert av ulike transportører som H<sup>+</sup>-monokarboksytsyre transportør (MCT), organisk anion transporterende polypeptid 2B1 (OATP2B1) i tarm og organisk anion transporterende polypeptid 1B1 (OATP1B1) i lever (Wu, Whitfield et al. 2000; Lau, Huang et al. 2007), men atorvastatin er også et substrat for P-gp, efflux-transportøren som begrenser biotilgjengeligheten (Wang, Casciano et al. 2001).

### *Metabolisme og Eliminasjon*

Atorvastatin blir metabolisert av CYP-enzymene til to aktive metabolitter 2-hydroksyatorvastatin og 4-hydroksyatorvastatin. Metabolittene blir også konvertert til tilhørende lakton og de to formene foreligger i likevekt (Kantola, Kivisto et al. 1998) (Figur 4). Konverteringen til lakton gjør legemiddelet mer lipofilt, og lipofilisiteten gir signifikant høyere affinitet til CYP-enzymene. Det er derfor sannsynlig at eliminasjonen hovedsakelig skjer via laktonet (Jacobsen, Kuhn et al. 2000). CYP3A er den viktigste underfamilien i metabolisme av HMG-CoA reduktasehemmere (Prueksaritanont, Gorham et al. 1997), men bidraget fra CYP3A5 aktiviteten er usikkert og bør studeres nærmere (Park, Kim et al. 2008). I tillegg til oksidering via CYP3A og laktonisering, er det også vist at atorvastatin gjennomgår fase 2 metabolisme via UGT (Prueksaritanont, Gorham et al. 1997; Black, Hayes et al. 1999; Igel, Sudhop et al. 2001; Prueksaritanont, Subramanian et al. 2002; Prueksaritanont, Tang et al. 2002; Prueksaritanont, Zhao et al. 2002). I lever blir atorvastatin tatt opp til eliminasjon av OATP1B1 (Lau, Huang et al. 2007). På bakgrunn av uttalt metabolisme både i lever og tarm, og som substrat for P-gp og OATP1B1, får derfor atorvastatin en lav biotilgjengelighet på ca. 12 % (SPC legemiddelverket), til tross for at absorpsjonen i utgangspunktet er nærmest

fullstendig (Williams and Feely 2002; Lennernas 2003). Dette gjør at legemiddelet egner seg til studier av prosesser involvert i biotilgjengelighet av legemidler, da de samme prosessene er involvert i å begrense biotilgjengeligheten til mange andre legemidler (Skottheim, Stormark et al. 2009).



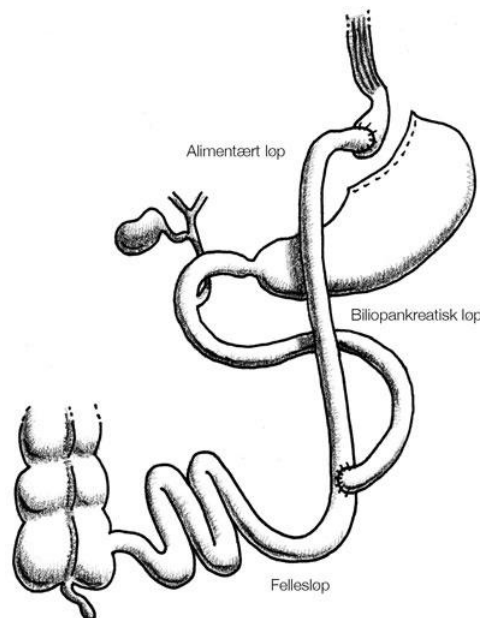
**Figur 4:** Kjemisk struktur av atorvastatin syren (øverst i midten), atorvastatin laktonet (nederst i midten), 2-hydroksyatorvastatin syre (øverst til venstre), 4-hydroksyatorvastatin syre (øverst til høyre) og deres korresponderende laktonformer (nederst til sidene) (Backman, Luurila et al. 2005). Det er foreslått at laktoniseringen skyldes  $\beta$ -oksidering av coenzym A-avhengig aktivering, og at hydrolysen av laktonene for både legemiddel og metabolitter, skyldes kjemisk degradering og esterase aktivitet (Prueksaritanont, Subramanian et al. 2002).

### 3.4 Overvektskirurgi

Fedme er i dag en verdensomspennende epidemi, og det er estimert at 1,7 billioner mennesker lider av overvekt. Andelen er høyest i USA, hvor omtrent to av tre lider av overvekt, og halvparten av dem lider av fedme. I Norge er 11,8 % overvektige og 2,4 % lider av fedme (Deitel 2003; Buchwald, Avidor et al. 2004; Groholt, Stigum et al. 2008). WHO (World Health Organization) definerer overvekt som BMI (body mass index)  $\geq 25 \text{ kg/m}^2$  og fedme som BMI  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$  (World Health Organization 2006). Alvorlig/sykelig fedme defineres som en BMI  $\geq 40 \text{ kg/m}^2$  eller BMI  $\geq 35 \text{ kg/m}^2$  med minst én følgesykdom. Sykelig overvekt er en kronisk sykdom assosiert med komorbiditet som type 2 diabetes mellitus, hyper-lipidemi, høyt blodtrykk, søvnapné, hjertesykdommer, slag, astma, degenerativ leddsykdom, kreft og depresjon. Disse følgesykdommene står ansvarlig for mer enn 2,5 millioner dødsfall på verdensbasis hvert år, og kan forkorte forventet levealder med 22 % (Fontaine, Redden et al. 2003; Buchwald, Avidor et al. 2004). Behandling av overvekt initieres med endring av livsstil i form av diett og økt fysisk aktivitet. Hvis dette ikke er tilstrekkelig alene, kan farmakoterapi introduseres. Sibutramin og orlistat har markedsføringstillatelse i Norge i dag, og gir et moderat vekttap, men uønskede og sjeldne, alvorlige bivirkninger begrenser bruken. Legemidlene har også utilstrekkelig effekt ved sykelig overvekt (Dickerson and Carek 2000; Hjelmessaeth, Hofso et al. 2007). Overvektskirurgi er en tredje strategi, og er ansett som en effektiv, og prisgunstig behandling for å oppnå permanent vekttap og bedre økonomiske, sosiale og medisinske vilkår som følge av komorbiditet (Buchwald 2005).

Moderne overvektskirurgi inkluderer både restriktive og malabsorptive prosesser. Restriksjon innebærer reduksjon av magesekkens volum, noe som medfører tidlig metthetsfølelse og kan begrense kaloriinntaket. Malabsorptive prosedyrer omfatter en effektiv forkorting av tynntarm slik at absorpsjonsarealet blir mindre (Aasheim, Mala et al. 2007). Kaloriinntaket blir redusert i tillegg til at ufordøyd mat som når den distale delen av tynntarm, vil stimulere til sekresjon av gastrointestinale hormoner som bidrar i regulering av appetitt og blodglukosenivå (Badman and Flier 2005). Effekten av malabsorptive prosedyrer avhenger av hvor stor del av tynntarmen som

forbikobles. Et av de vanligste inngrepene i Norge i dag er gastrisk bypass, og dette er også for tiden den mest populære prosedyren utført på verdensbasis. Det er en prosedyre der magesekken blir forminsket samtidig som tynntarmen blir forkortet. Øvre del av magesekk kuttes slik at den former en liten pose og denne posen festes til nedre del av tynntarmen (Figur 5). Hvor mye av tynntarmen som blir forbikoblet (bypass), kan variere. Det finnes mange andre varianter av overvektskirurgi, men gastrisk bypass, med den høyeste suksessraten, blir ansett som gullstandard. Den utføres både som åpen operasjon og laparoskopisk, men laparoskopisk metode er foretrukket da den reduserer risikoen for alvorlige komplikasjoner, reduserer smerter postoperativt og gir et kortere sykehusopphold (Buchwald 2005; Miller and Smith 2006; Aasheim, Mala et al. 2007; Elder and Wolfe 2007).



**Figur 5:** Gastrisk bypass. Magesekken er forminsket og atskilt fra resten av ventrikkelen. Øvre del av tynntarm er forbikoblet i et alimentært løp, og galle og bukspytt passerer i et bilio-pankreatisk løp (Aasheim, Mala et al. 2007).

Endringer i anatomien i GI som følge av en gastrisk bypass operasjon kan påvirke biotilgjengeligheten av legemidler. Hvorvidt dette har klinisk betydning kommer an på intervensjonssted, lengde av bypass og type legemiddel. En forkortet tarm gir et

mindre absorpsjonsareal og begrenset absorpsjonstid. Det kan være av relevant betydning for legemidler med forlenget eller forsinket frisetting, og entero- eller filmdrasjerte formuleringer. Disse absorberes i løpet av 2-12 timer, og ved forkortet lengde på tarmen, kan de ha passert gjennom GI før absorpsjonen er fullstendig. Ved innskrenking av magevolumet kan mindre saltsyre bli produsert. Økt pH i magesekken og tynntarm kan påvirke legemidler som er avhengige av et surt miljø for å kunne løse seg og dermed bli absorbert (Miller and Smith 2006).

CYP-enzymene, som er ansvarlig for metabolismen i tarm, er lokalisert i villiene ut mot lumen. Ileum er 10 ganger lenger enn duodenum, likevel er det estimert at duodenum inneholder halvparten så mye CYP3A som ileum. Årsak til denne påfallende forskjellen er at mukosa i duodenum er mye rikere på villi. Jejunum har en gradvis nedgang i tetthet av villi, fra proksimal til distale ende. Jejunum er 8 ganger lenger enn duodenum og er derfor absolutt sett rikest på CYP3A-enzym (Paine, Khalighi et al. 1997). P-gp er også lokalisert i villiene, og ved en gastrisk bypass blir denne barrieren av enzymer og transportører forbikoblet, og følgelig kan andel legemiddel som når det systemiske kretsløp øke. Det foreligger noen studier og enkle case-rapporter på pasienter som har gjennomgått overvektskirurgi, men det er begrenset hvor mye disse studiene kan fortelle. Populasjonene som inngår er ofte svært avgrensede og få av dem omhandler gastrisk bypass operasjon (Skottheim, Stormark et al. 2009). En eldre farmakokinetikk studie av digoxin utført på 7 pasienter som hadde gjennomgått jejunal bypass (hvor distale jejunum og proksimale ileum blir fjernet), viste ingen forandring i absorpsjon. Digoxin absorpsjon foregår derimot hovedsakelig i duodenum og øvre del av jejunum, og det er derfor uklart om en gastrisk bypass ville hatt større påvirkning på serumkonsentrasjonen av digoxin (Beermann, Hellstrom et al. 1973). Det er også utført en studie på absorpsjon av orale prevensjonsmidler i 7 kvinner som har gjennomgått jejunal bypass. Plasmanivået av norethisteron og levo-norgestrel var mindre hos de opererte enn hos kontrollgruppen. Forfatterne spekulerte i at ettersom mesteparten av gestagener blir absorbert i ileum, har operasjonen ført til utilstrekkelig absorpsjon (Victor, Odland et al. 1987). En nyere publikasjon har vist at gastrisk bypass gir lavere biotilgjengelighet av moderne immunosuppressiva som takrolimus, sirolimus og mykofenolat, og at en høyere

dosering bør vurderes sammenlignet med pasienter som ikke har utført gastrisk bypass (Rogers, Alloway et al. 2008). Det finnes også studier som har påvist at gastrisk bypass ikke gir noen endring i farmakokinetikken av legemidler (Park, Shah et al. 2009). Legemidler har ulike farmakokinetiske profiler, og det er hensiktsmessig å evaluere effekten av overvektskirurgi på farmakokinetikk, fra legemiddel til legemiddel.

### 3.5 Analysestudier av proteinuttrykk i humane biopsier

#### 3.5.1 Cellefraksjonering

Cellefraksjonering er en mye brukt analytisk metode i forskning på celler, både i analyse av oppbygging og funksjon, av celler og deres bestanddeler. I cellefraksjonering inngår homogenisering og sentrifugering. De fleste laboratorier bruker protokoller som ligner hverandre, men utstyr og buffer-løsninger kan variere. En mye brukt teknikk til å homogenisere vev er ved bruk av pistill. Potter-Elvehjem homogenisator består av en teflonpistill festet til et motordrevet roterende metallskaft. Dounce homogenisator har en pistill av glass som opereres for hånd (Figur 6). Begge instrumentene homogeniserer ved at vev- eller celleduspensjoner blir klemte mellom pistill og veggen på beholderen (Graham 1984).



**Figur 6:** Dounce homogenisator (Limited and Estate 2009).

Precellys 24 (VWR) (Figur 7) er et nyere apparat som tillater effektiv homogenisering av opptil 24 prøver samtidig, på kort tid. Buffer og prøvemateriale plasseres i Precellys rør som på forhånd er fylt med små kuler. Det finnes forskjellige kit for ulike vev, hvor kulene varierer med både type og størrelse. Rørene blir ristet i apparatet med definert tid, fart, antall sykluser og spesifisert pause mellom hver syklus. Dette sikrer effektiv og reproducerbar homogenisering, med minimalt svinn av vev og cross-over kontaminering under prosessen (Bertin 2009).



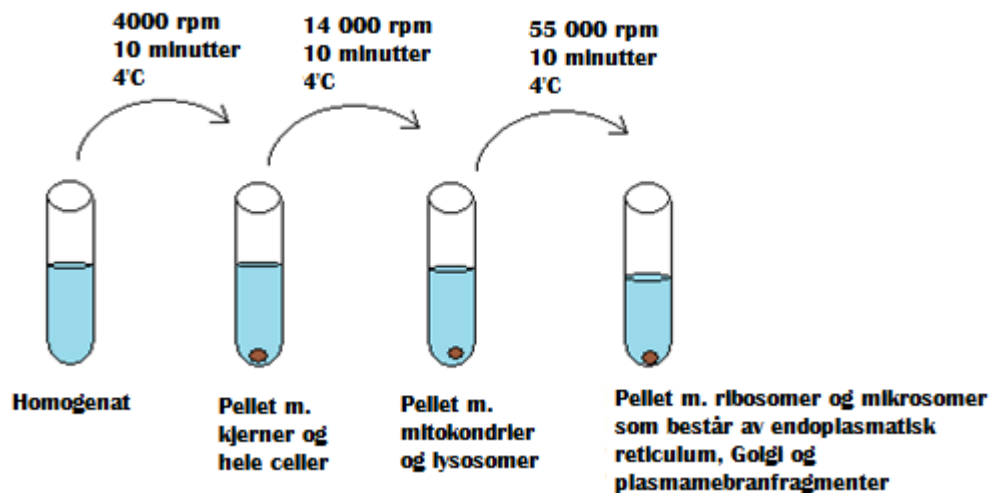
**Figur 7:** Precellys 24 (Bertin 2009).

Etter homogenisering separeres homogenatet i ulike fraksjoner ved bruk av differensial sentrifugering. Sentrifugeringen baseres på de fysiske egenskapene til de ulike organelle i cellen som størrelse, form og tetthet. Prinsippet for sentrifugeringen kan forklares matematisk ved hjelp av Svedbergs ligning.

$$\frac{dx/dt}{\omega^2 x} = \frac{2r^2(p_p - p_m)}{g_\eta}$$

Denne ligningen beskriver sedimentasjon av en rund partikkel i en viskøs væske, hvor  $x$  er avstanden fra rotasjonsaksen,  $t$  er tid,  $\omega$  er vinkel hastigheten,  $r$  er

partikkelens radius,  $p_p$  og  $p_m$  er tettheten til henholdsvis partikkelen og mediet og  $\eta$  er viskositeten i mediet. I sukrosebuffer, hvor viskositeten er lav og hvor tettheten er lavere enn for partiklene i en celle, vil derfor store partikler sedimentere på lav hastighet, mens mindre partikler krever høyere hastighet for å bli sedimentert (Castle 2004). For å analysere CYP3A-enzymene, er det nødvendig å fraksjonere ut ER membranen, ettersom det er den CYP3A er inkorporert i. Når vev blir homogenisert, vil ER membranen fragmenteres og danne små vesikler kalt mikrosomer. CYP3A-enzymene vil være inkorporert i disse mikrosomene, og kan isoleres ut med pelleten hvor fraksjonen med ER mikrosomene befinner seg (Alberts 2002). Det kreves en hastighet på 108 000 g (55 000 rpm) for å sentrifugere mikrosomene ned. Denne fraksjonen med CYP-enzymen blir ofte betegnet S9 fraksjon, men både betegnelser og fraksjonstrinnene som inngår i sentrifugeringsprosessen kan variere (Lown, Bailey et al. 1997) (Figur 8).



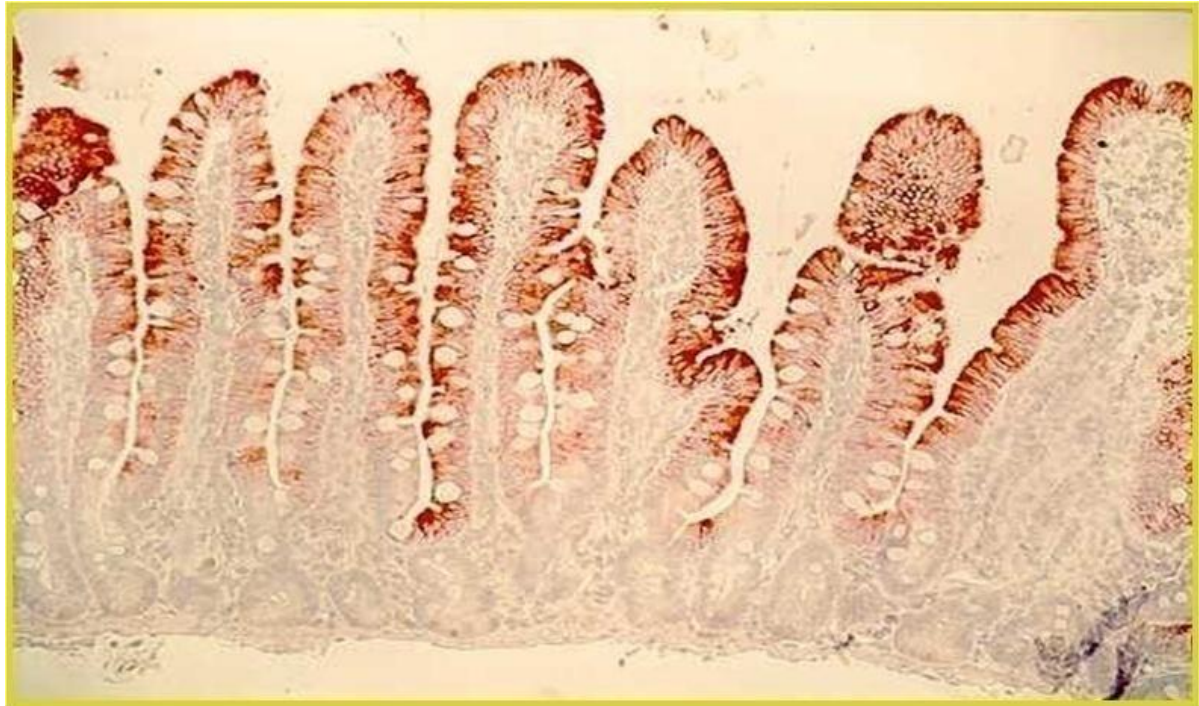
**Figur 8:** Trinnvis sentrifugering ved økende hastighet vil fraksjonere homogenatet av vev. Generelt kreves høyere hastighet desto mindre den subcellulære komponenten er.



### 3.5.2 Måling av CYP3A4, CYP3A5 og villin ved Western blott

Western blotting (immunoblotting) er en analytisk teknikk som brukes til å detektere spesifikke proteiner fra vevsprøver eller ekstrakter. Prøver appliseres på nitrocellulosemembran og uspesifikk binding blir blokkert med blokkeringsbuffer (blotto). Proteinene blir detektert ved bruk av respektive antistoffer og antistoff-bindingen blir visualisert ved bruk av tilhørende sekundære antistoff og kjemiluminesens deteksjon. Kvantifiseringen skjer så via densitometri. I tradisjonell Western blotting er det vanlig å separere proteiner ved elektroforese før deteksjon. Bio-Dot mikrofiltrasjonsapparat (Bio-Rad Laboratories Inc, California, UK) er et nyere blotte-verktøy som tillater direkte påføring av prøvemateriale på nitrocellulosemembranen uten å kjøre elektroforese først, så lenge antistoffene brukt til å detektere proteinene, er spesifikke nok til at en separering av proteiner er unødvendig. Det er mulig å påvise flere forskjellige proteiner på en og samme membran. For å gjøre dette må membranen strippes for antistoff, før nye antistoff for andre proteiner kan påføres. Membraner kan bli strippet og reblottet så lenge det er mulig å få et signal, men som regel blir protein-signalene svake etter 3 strippeprosesser.

CYP3A-enzymet i tynntarm uttrykkes kun i modne enterocytter, på tuppene av villi i mukosa (Figur 9). En biopsi tatt av mukosa kan ha ulik andel av modne enterocytter avhengig av hvor dypt biopsien er tatt. Desto dypere biopsien er, desto lavere vil andelen CYP-enzymet utgjøre av totalprotein nivået. For å korrigere for dette, kan villin, et cytoskeletal protein uttrykket i de modne enterocyttene, brukes til normalisering av uttrykket av CYP-enzymet (Lown, Bailey et al. 1997).



**Figur 9:** Immunoperoxidase farget villi i jejunum etter inkubasjon med antistoff (anti-HLp) som reagerer med alle CYP3A proteiner (forstørret 300 ganger). De mørke områdene indikerer lokasjonen av CYP3A proteiner (Kolars, Lown et al. 1994).

### 3.6 Farmakokinetikkstudier

For å kunne optimalisere farmakoterapeutisk behandling, på bakgrunn av interindividuell variasjon i fysiologi er det viktig å utføre farmakokinetiske studier. En farmakokinetisk studie er en analytisk metode utført for å evaluere farmakokinetikken av legemidler i mennesker, enten ved enkel dosering eller ved flerdoseringsregimer. Prøver av blod og eventuelt urin og fæces blir samlet fra studiepopulasjonen, og konsentrasjon av legemiddel og metabolitter blir målt ved bestemte tider. Farmakokinetiske parametre som halveringstid ( $t_{1/2}$ ), distribusjonsvolum ( $V_d$ ), clearance (CL), maksimum blodkonsentrasjon ( $C_{max}$ ), minimum blodkonsentrasjon ( $C_{min}$ ), tid til maksimal blodkonsentrasjon ( $t_{max}$ ) og areal under blodkonsentrasjons-tids kurven (AUC) blir estimert, og skaper grunnlag for legemiddelets farmakokinetiske profil, og kan for eksempel brukes til utarbeidelse av individuelt passende doseringsregimer.

### 3.7 Hensikten med oppgaven

Atorvastatin er et kolesterolsenkende legemiddel med lav biotilgjengelighet (12 %) som følge av omfattende CYP3A4 og CYP3A5 metabolisme både i tarm og lever. I tillegg er legemiddelet et substrat for P-gp i tarm og OATP1B1 i lever. I samarbeid med Senter for sykelig overvekt ved Sykehuset i Vestfold, er det utført en klinisk studie på pasienter som gjennomgår overvektskirurgi. Hovedstudien har som mål å se på hvordan gastrisk bypass påvirker biotilgjengeligheten av atorvastatin. Det er utført farmakokinetikk undersøkelser av atorvastatin, både før og etter operasjonen, i tillegg til at det er tatt biopsier fra lever og ulike deler av mage- og tarmsystemet, under og etter operasjonen.

Hensikten med denne oppgaven var å utvikle en metode for å homogenisere biopsier og kvantifisere CYP3A4 og CYP3A5 i tarm- og leverbiopsier ved bruk av Western blott. I tillegg skulle uttrykket av CYP3A4 og CYP3A5 fra kvantitative målinger, relateres til individuell systemisk eksponering av atorvastatin, for å se om det var noen sammenheng mellom uttrykk av CYP3A4 og CYP3A5 og biotilgjengeligheten av atorvastatin.

## 4. MATERIALE

Bovint serum albumin	Pierce, Oud-Beijerland, Nederland
Bio-Rad Protein Assay fargeløsning	Bio-Rad Laboratories Inc, California, USA
Bromfenolblå	Bio-Rad Laboratories Inc, California, USA
Destillert vann	Aquatrín A4S, Bibby Science Products SA, Frankrike
ECL kjemiluminescense reagens	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Fettfri Tørrmelk	Normilk AS, Oslo, Norge (gave)
Fosfat	Merck, Darmstadt, Tyskland
Glyserol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
HCL	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Insekt CYP3A4-xenosomer (lot pd34.283776B)	Larodan Fine Chemicals AB, Malmö, Sverige
Insekt CYP3A5-xenosomer (lot pd35.30742B)	Larodan Fine Chemicals AB, Malmö, Sverige
Isopropylpropanol	Arcus produkter AS
Kodak AL-4 røntgenfiksator	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Kodak GBX røntgenfiksator	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Kodak BioMax MS Film	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Kodak LX-24 røntgenfremkaller	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Kodak GBX røntgenfremkaller	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
NaCl	Merck, Darmstadt, Tyskland
Primært antistoff CYP3A4 (kanin anti-CYP3A4 mab)	Dr. Rob Edwards, Imperial College School of Medicine, Hammersmith Hospital, UK (gave)
Primært antistoff CYP3A5 (kanin anti-CYP3A5 mab)	Dr. Rob Edwards, Imperial College School of Medicine, Hammersmith Hospital, UK (gave)
Primært antistoff villin (mus anti-villin mab) (Lot VR1361181)	Chemicon International, Inc., Millipore, Oslo, Norway
SDS	Bio-Rad Laboratories Inc, California, USA
Sekundært antistoff (geit anti-kanin mab) (LS1706515)	Bio-Rad Laboratories Inc, California, USA
Sekundært antistoff (geit anti-mus mab) (LS1706516)	Bio-Rad Laboratories Inc, California, USA
Sukrose	Merck, Darmstadt, Tyskland
Tris	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Trizol	Invitrogen life technologies, Carlsbad, California, USA
Tween 20	Bio-Rad Laboratories Inc, California, USA
$\beta$ -merkaptotanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

## 5. METODE

### 5.1 Pasientpopulasjon

I denne studien inngikk biopsier fra 8 pasienter som alle hadde gjennomgått en gastrisk bypass operasjon. Under operasjonen ble det tatt biopsier av lever, magesekk, ileum og jejunum på alle pasientene. I pasient 5, 7, 11 og 12 var det i tillegg tatt biopsier ved gastroskopi, fra den gjenværende delen av tynntarmen, 2 år etter operasjonen. Disse biopsiene kalles farmakokinetikk 3 (PK3). Av pasientene ble pasient 6, 11 og 12 påvist å uttrykke funksjonelt CYP3A5 protein (CYP3A5\*1/CYP3A5\*3). Alle pasientene fikk daglig behandling med 20-80 mg atorvastatin (Lipitor®). Farmakokinetiske undersøkelser med 8-timers intervall ( $AUC_{(0-8)}$ ) ble utført dagen før operasjonen og 3-6 uker etter operasjonen. Den overordnede studien var designet som en prospektiv, åpen, kontrollert, ikke-randomisert, enkeltcenter studie, og den var utført i overensstemmelse med internasjonale og nasjonale retningslinjer og godkjent av Etisk komité og alle norske relevante myndigheter. Studien er registrert i ClinicalTrials.gov (NCT00331565) Demografiske data av pasientene er presentert i tabell 1 (Skottheim, Stormark et al. 2009).

**Tabell 1:** Demografiske data over pasientpopulasjonen. Kvinne (K), mann (M), Body mass Index (BMI), Alimentary limb (AL), Biliopancreatic limb (BPL), Dose tilsvarer daglig dose atorvastatin i mg og Tidsintervall er tiden i uker fra farmakokinetikkstudier ble utført før operasjon til farmakokinetikkstudier utført etter operasjon (Skottheim, Stormark et al. 2009).

Pasient (rekode)	Kjønn (mann/kvinne)	Alder (år)	BMI pre	BMI post	AL (cm)	BPL (cm)	Dose (mg)	Tidsintervall (uke)
4	M	54	34	36	120	120	80	6
5	M	54	40	40	120	120	80	5
6	K	56	45	41	120	80	40	5
7	K	64	40	37	120	110	20	4
8	M	56	46	42	120	120	20	6
9	K	29	38	34	120	100	20	4
11	K	59	47	43	120	80	40	5
12	K	57	40	36	120	80	40	4
Gj.snitt		52	41	39	120	101	44	5
Min.		29	34	34	120	80	20	4
Maks.		64	47	43	120	120	80	6
Median	5 K/3 M	56	40	39	120	101	40	5

## 5.2 Analysemetoder

### 5.2.1 Løsning til cellefraksjonering

---

#### SUKROSE BUFFER 0,32 M, pH 7,4

---

0,32 M Sukrose	27,4 g
10 mM Trizmabase	0,30 g
1,0 mM EDTA	0,093 g
Dest. Vann	ad 250 ml

---

### 5.2.2 Prosedyre for cellefraksjonering

Biopsiene ble skåret i to biter, ved bruk av sterilt utstyr, på kald glassplate. Glassplaten ble vasket med isopropylpropanol for å sikre et RNase-fritt miljø som hindrer nedbryting av mRNA. Biopsidelen til mRNA kvantifisering ble lagt i et sterilt eppendorfrør, veid og fryst ned ved  $-80^{\circ}\text{C}$ . Biopsidelen til kvantifisering av proteiner ble lagt i et Precellys rør (CK 28 kit), et kit med keramikk kuler som egner seg til flere typer vev, og røret ble tilsatt 0,32 M sukrosebuffer (pkt 5.2.1). Forholdet mellom vekt av biopsi og tilsatt sukrosebuffer ble standardisert til 5 %. Dersom biopsien var så liten at volum å tilsette var mindre enn 400  $\mu\text{l}$ , ble 400  $\mu\text{l}$  tilsatt for å oppnå et tilstrekkelig homogeniseringsvolum. Precellysrørene med biopsiene ble plassert i Precellys 24 apparatet og homogeniseringsprogrammet ble kjørt med 5000 rpm, 3x50 sekunder (20 sekunder pause), et program bestemt på bakgrunn av utført stresstesting og protokoller med lignende typer vev (Bertin 2009). Under stresstesting ble biopsiene kjørt gjennom gjentatte homogeniseringsprogrammer (40, 60, 100, 160 og 310 sekunder i totaltid), og konsentrasjonen av CYP3A4 ble målt for å se om tiden kunne påvirke recovery. Etter homogeniseringen ble homogenatene overført til ultrasentrifugerør, og sentrifugert 1 time ved  $4^{\circ}\text{C}$  og 108 000 g (55000 rpm) ved Beckman sentrifuge (Dan Meszansky AS). Supernatantene ble overført til eppendorfrør og pelletene ble reløst i 5 % standardisert volum ved bruk av Dounce homogenisator (8 pumpinger med vri) (Figur 6). De mindre biopsiene som var tilsatt 400  $\mu\text{l}$  før homogeniseringen, ble nå tilsatt standardisert volum av sukrosebuffer.

Prøvene med reløste pelletter og supernatanter ble så fryst ned ved 70°C inntil videre behandling.

### 5.2.3 Løsning til Western blott

#### 2 x SAMPLEBUFFER

0,5 M Tris-HCL pH 6,8	12,5 ml
10 % SDS	20 ml
Glycerol	10 ml

#### 1 x SAMPLEBUFFER

50 % 2 x Samplebuffer	20 ml
50 % Dest. Vann	20 ml

#### TBS-LØSNING pH 7,5\*

10 mM Trizabase	2,43 g
100 mM NaCl	11,69 g
Dest. vann	ad 2000 ml

#### T-TBS LØSNING pH 7,5\*

TBS-Løsning	1500 ml
0,05 % Tween 20	750 µl

#### BLOTTO 125 ml/membran\*\*

10 mM Trizabase	2,43 g
100 mM NaCl	11,69 g
Dest. vann	ad 2000 ml

\*Løsningene ble oppbevart i kjøleskap.

\*\*Løsningen ble varmet opp under omrøring, filtrert gjennom Whatman 4 filterpapir og oppbevart i kjøleskap i ca. 1 uke.

### 5.2.4 Måling av CYP3A4, CYP3A5 og villin ved Western blott

For å kunne kvantifisere CYP3A4 og CYP3A5 ble det laget standardrekker av rekombinante insekt-mikrosomer med deklartert mengde av henholdsvis CYP3A4 (0,95 nmol/ml funnet spektrofotometrisk) og CYP3A5 (1,1 nmol/ml funnet spektrofotometrisk), som lot seg detektere innen et lineært område. For CYP3A4 ble det laget en hjelpeløsning med mikrosomer og 1 x samplebuffer (pkt.5.2.3) i

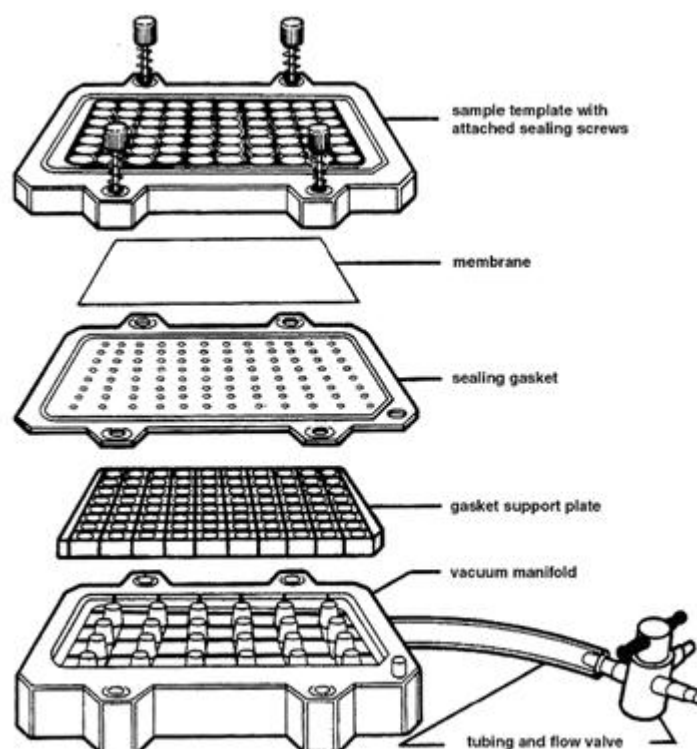
forholdet 1:50. Hjelpeløsningen ble deretter fortynnet videre til en standardrekke i konsentrasjonsområdet 11,9  $\mu\text{M}$  til 58,9  $\mu\text{M}$ . For CYP3A5 ble det laget en hjelpeløsning med mikrosomer og 1 x samplebuffer i forholdet 1:100. Hjelpeløsningen ble fortynnet videre til en standardrekke i konsentrasjonsområdet 9,67  $\mu\text{M}$  til 98,2  $\mu\text{M}$ . Standardrekkene ble preparert med 10 %  $\beta$ -merkaptoetanol og 5 % bromfenolblå, og prøvene ble til slutt kokt i 5 minutter. Det ble laget en batch av villin standard ved å blande løsning med reløst pellet fra flere pasientbiopsier. Denne ble fortynnet til 1:200. Pasientprøver med reløst pellet og supernatanter ble fortynnet til passende konsentrasjoner for deteksjon, og deretter preparert og kokt som standardrekken. I utgangspunktet ble de fortynnet i forholdet 1:100, men flere av dem måtte fortynnes på nytt, i enten lavere eller høyere fortynning, for å bli detektert innen det lineære området på standardkurven.

### *Western blott*

Blotteprosessen ble utført ved å slå sammen ny teknologi med tradisjonell Western blotting. Bio-Dot apparatet ble vasket og tørket, og nitrocellulosemembranen ble klippet til og fuktet i tris-bufret saline-løsning (TBS) (pkt.5.2.3) i 10 minutter. Bio-Dot apparatet med nitrocellulosemembranen ble deretter satt sammen som anvist i figur 10. Luftbobler under membranen ble fjernet og skruene på apparatet ble festet skikkelig ved hjelp av vakuum. Alle brønnene ble refuktet med 100  $\mu\text{l}$  TBS ved bruk av 8 kanalspipette og bufferen ble så fjernet forsiktig med vakuum. Standardprøver, pasientprøver og villinstandard i volum på 15  $\mu\text{l}$  ble så pipettert direkte i brønnene, og passerte igjennom membranen kun ved gravitasjonskraften. Prøvene ble blandet på wirlmikser og pipettespissen tørket av for hver pipettering. På hver membran ble det påført en standardrekke i 2 paralleller for hver konsentrasjon. Pasientprøvene med reløst pellet og supernatanter ble påført i 3 paralleller, og kontrollen med villin ble påført i 2 eller flere paralleller. Alle brønnene ble deretter tilsatt 2 x 200  $\mu\text{l}$  med tris-tween-bufret saline-løsning (T-TBS) (pkt.5.2.3) og vaskeløsningen ble forsiktig trukket igjennom med vakuum. Blottoen som ble brukt i metoden egnet seg ikke til Bio-Dot apparatet, da løsningen ikke vil trekke gjennom membranen, så apparatet ble skrudd fra hverandre etter vask med T-TBS, med vakuomet fremdeles koblet til, og



blotteprosedyren fortsatte med modifisert versjon av Western metode beskrevet av Paine et al. (Paine, Hart et al. 2006).



**Figur 10:** Sammenkobling av Bio-Dot apparatet. Hentet fra bruksmanualen til Bio-Dot apparatet.

Membranen ble fjernet fra apparatet og lagt i 30 ml blotto (pkt.5.2.3) i 60 minutter, ved romtemperatur med vipping på Bellydancer (Alfa-Lab). Primært antistoff fortynnet i blotto (pkt.5.2.3), i følge tabell 2, ble tilsatt membranen (30 ml/ membran) og inkubert over natten i kjølerom med vipping. Under studien ble det brukt 2 forskjellige batcher av primært antistoff for CYP3A4, og disse ble fortynnet likt. Primært antistoff ble hellet av og fryst ned. Membranen ble så vasket 3 x 10 minutter med blotto ved romtemperatur og vipping før peroksidasermerket sekundært antistoff (tabell 2), fortynnet i blotto, ble tilsatt (30 ml /membran) og membranen ble inkubert i 60 minutter ved romtemperatur med vipping. Sekundært antistoff ble kastet etter bruk og membranen ble vasket 3 x 10 minutter i blotto, skyllet 2 ganger med T-TBS og

vasket 2 x 10 minutter i T-TBS ved romtemperatur med vipping. Trinnvis kortversjon av metoden er presentert i appendiks.

**Tabell 2:** Oversikt over primære antistoffer og tilhørende sekundære antistoffer, og deres fortynninger.

Protein	Primært Antistoff	Fortynning	Sekundært Antistoff	Fortynning
CYP3A4	Kanin anti-CYP3A4 mab	1:10 000	Geit anti-kanin mab	1:3 000
CYP3A5	Kanin anti-CYP3A5 mab	1:10 000	Geit anti-kanin mab	1:3 000
Villin	Mus anti-villin mab	1:10 000	Geit anti-mus mab	1:1 500

### *Fremkalling i mørkerom*

Membranen ble inkubert 1 minutt med 4 ml kjemiluminescense-reagens (ECL), og ble deretter pakket inn i plastfolie og plassert i fremkallingskassetten med film (Kodak BioMax Ms Film). Det ble fremkalt 2 filmer av hver membran. Eksponeringstiden varierte fra membran til membran avhengig av antistoff og fortynninger av prøver. Ved bruk av antistoff for CYP3A4 (første batch), CYP3A5 og villin var eksponeringstiden 2-5 og 12-15 minutter. Den nyere batchen med antistoff for CYP3A4 måtte eksponeres lenger, 20 og 45 minutter. Filmen ble fremkalt i 30 sekunder i Kodak LX-24 røntgenfremkaller (120 ml fremkaller + 280 ml vann), skyllet i vann, fiksert i 5 minutter i Kodak AL-4 røntgenfiksator (120 ml fiksator + 280 ml vann) og vasket i springvann i 1 minutt før den ble tørket.

### *Kvantifisering av proteiner*

Filmen med bildet av dot-blottet ble skannet med vanlig hp Scanjet 5590 skanner (Hewlett-Packard Norge as, Oslo, Norge) via skanningsprogrammet HP Photo Imaging (Hewlett-Packard Norge as, Oslo, Norge). Bildene ble lagret som TIFF-filer og importert til dataprogrammet GeneTools (SynGene, Cambridge, UK), et bildeanalyse program, utviklet for alle former for geler, som kvantifiserer intensiteten av flekkene der prøve ble påført. Dot-blott flekkene ble funnet manuelt i programmet, som så beregnet intensiteten og korrigerte for bakgrunn. Dataene ble overført til Excel 2007 og GraphPad Prism versjon 5. Proteinmengden ble bestemt ved hjelp av

standardkurve med rekombinante insekt-mikrosomene laget ved lineær regresjon, og villinmengden i pasientprøvene ble relatert til villin standarden som vist i formelen under.

$$\text{Relativt forhold til villin standard} = \frac{\text{Intensitet (villin prøve)} \times \text{Fortynning (villin standard)}}{\text{Intensitet (villin standard)} \times \text{Fortynning (villin prøve)}}$$

Resultater for kvantifiserte mengder CYP3A4 for pasientene som inngikk i studien, ble presentert i tabell, og mengden CYP3A4 ble angitt i fmol/mg protein. Det ble estimert CYP3A4 i ileum, jejunum, magesekk og lever hos alle pasientene. Estimerer for PK3 ble kun utført for pasienter hvor PK3 biopsiene var tatt, ved utførelse av forsøket. De kvantifiserte mengdene CYP3A4, med noen unntak, ble estimert fra intensiteter innen det lineære området på standardkurven. Tabeller for estimerer av CYP3A4 i biopsier for hver enkelte pasient er presentert i appendiks. Mengden CYP3A4 ble her angitt i fmol/g biopsi og fmol/mg protein.

### *Strippeprotokoll av membran for Western blott*

En og samme membran, blottet med pasientprøver, kunne i utgangspunktet bli brukt til å kvantifisere både CYP3A4 og CYP3A5, så lenge det var påført standardrekker for CYP3A4 og CYP3A5 på membranen. Membranen måtte da bli strippet for antistoff før påføring av nytt antistoff. Dette ble gjort ved at membranen ble inkubert i stripe-buffer (100 mM  $\beta$ -merkaptoetanol, 2 % SDS og 62,5 mM Tris, pH 6,8) i 30 minutter ved 50°C, med sporadisk vipping. Deretter ble den vasket 2 x 10 minutter i store mengder T-TBS før membranen ble reblokkert med blotto i minst 1 time. Membranen ble så blottet med nytt respektivt primært og sekundært antistoff som tidligere.

### **5.2.5 Validering av metoden**

En estimering av intradag presisjon i Western blott metoden ble utført ved å blotte 5 paralleller av standardrekken for CYP3A4, i 8 ulike fortynninger, på en membran.

Dot-blottet ble fremkalt, og relativt standardavvik ble beregnet for parallellene. Interdag presisjon ble validert ved å sammenligne estimert CYP3A4 mengde for en biopsi, fra 4 forskjellige dot-blott. Prøve med reløst pellet opparbeidet fra biopsi av magesekken i pasient 9, i fortynning 1:100, ble blottet på 4 separate dager. Gjennomsnittet og standardavviket for de estimerte mengdene ble beregnet. I tråd med retningslinjer for validering av bioanalyser, bør variasjonskoeffisienten ved måling av presisjon være under 15 % og under 20 % ved kvantifiseringsgrensen. (U.S Department of Health and Human Services 2001).

### **5.2.6 Prosedyre for måling av totalprotein**

Måling av totalprotein i vevsprøvene ble utført med utgangspunkt i metoden beskrevet av Bradford (1976). Standardrekke med bovint serumalbumin (BSA), i 7 fortynninger med kjente konsentrasjoner (0-300 µg/ml), og vevsprøver fortynnet med PBS ble pipettert i volum på 10 µl, i brønner på en mikroplate. Sterilfiltrert Bio-Rad Protein Assay fargeløsning (10 ml Bio-Rad med Coumassi Brilliant Blue G-250 og 40 ml destillert vann), i volum på 200 µl, ble pipettert over i brønnene med proteinløsning, og dette ble inkubert i 5 minutter. Komplekset som dannes mellom proteinet og Bio-Rad reagensen gir en fargeforandring fra rød til blå og absorbansnivået for reagensen heves fra 365 til 595 nm. Den totale mengden protein ble derfor estimert via spektrofotometrisk måling ved 595 nm bølgelengde i Wallac 1420 (Perkin Elmer). Totalprotein i prøvene ble beregnet fra standardkurven via lineær regresjon. Prøvene som ikke viste absorbans innen standardkurven ble fortynnet videre og analysert på nytt.

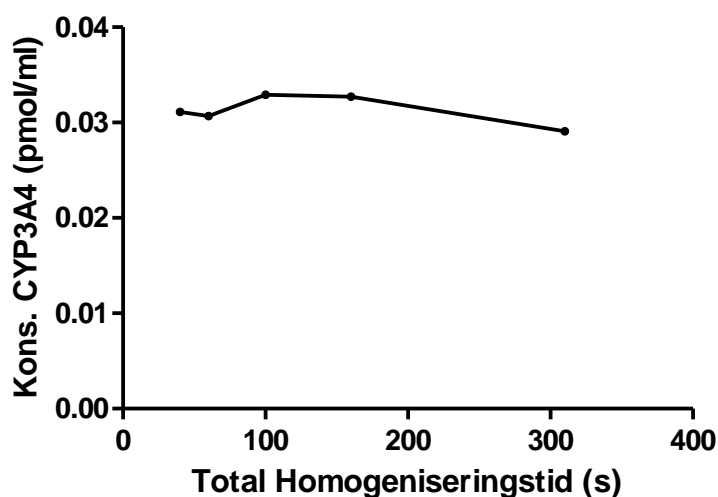
## 6. RESULTATER

### 6.1 Metodeutvikling

#### 6.1.1 Metodeutvikling cellefraksjonering

##### *Homogenisering*

Homogeniseringsprogrammet i Precellys 24 som ble valgt, ble validert ved stress-testing, og resultatene viste god recovery over tid. Detektert mengde CYP3A4 var stabil fra 100 til 160 sekunder, men viste svak nedgang etter 160 sekunder (Figur 11).



**Figur 11:** Konsentrasjonen av CYP3A4 i prøveløsninger utsatt for homogenisering over tid, henholdsvis 40, 60, 100, 160 og 310 sekunder.

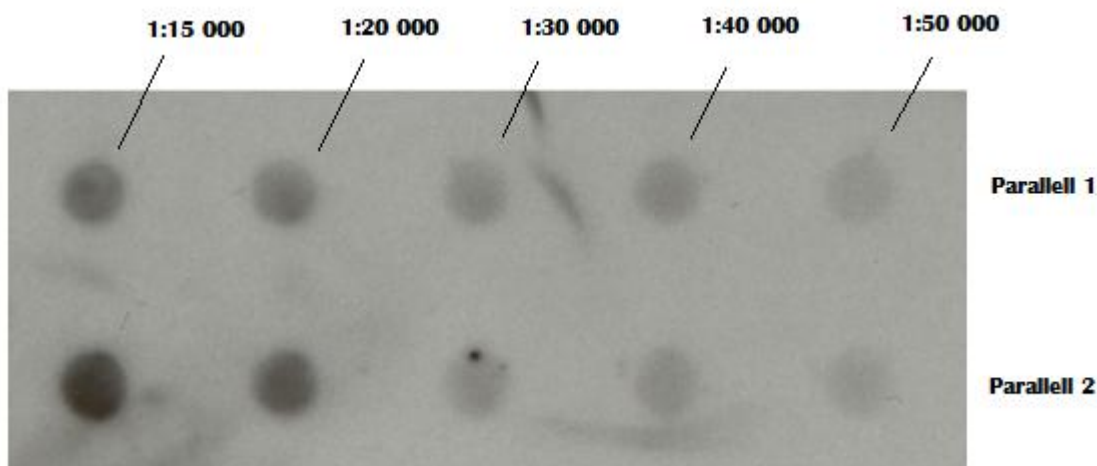
##### *Sentrifugering*

Differensial sentrifugering med 4 trinn (Figur 8) ble forsøkt for homogenatene fra pasient 6, men viste tilstedeværelse av CYP3A4-enzymet i flere av fraksjonene, og ikke kun i den siste fraksjonen (reløst pellet, P4) hvor mikrosomene med CYP-enzymet var forventet å være (data ikke vist).

### 6.1.2 Metodeutvikling kvantifisering av proteiner

#### *Western blott*

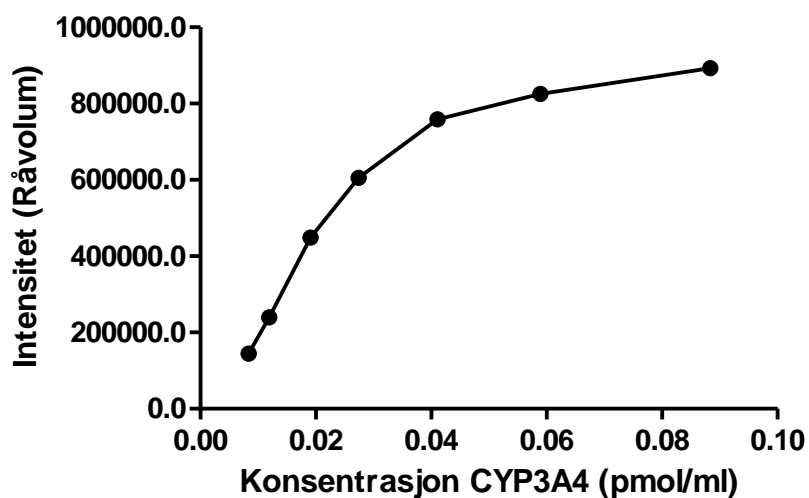
Western blott metoden ble forsøkt fullført med Bio-Dot mikrofiltrasjonsapparatet, men tørrmelkspartiklene i blotto-løsningen (pkt 5.2.3) brukt til å blokkere for uspesifikk binding ble for store, selv etter filtrering gjennom Whatman 4 papir, og ville ikke trekke gjennom membranen. Membranen ble derfor fjernet fra Bio-Dot apparatet etter første vasketrinn med T-TBS (pkt 5.2.3) og blotteprosedyren fortsatte med tradisjonell Western blott metode. Figur 12 viser et eksempel på et blott laget ved bruk av Bio-Dot mikrofiltrasjonsapparatet, hvor standardrekke for CYP3A4 i 5 fortynninger (1:15 000, 1:20 000, 1:30 000, 1:40 000 og 1:50 000), er blottet i 2 paralleller, i volum på 15 µl. Reduksjon i fargeintensiteten i flekkene fra venstre til høyre viser en lineær sammenheng med økende fortynning, og blottet viser en tydelig likhet mellom parallellene.



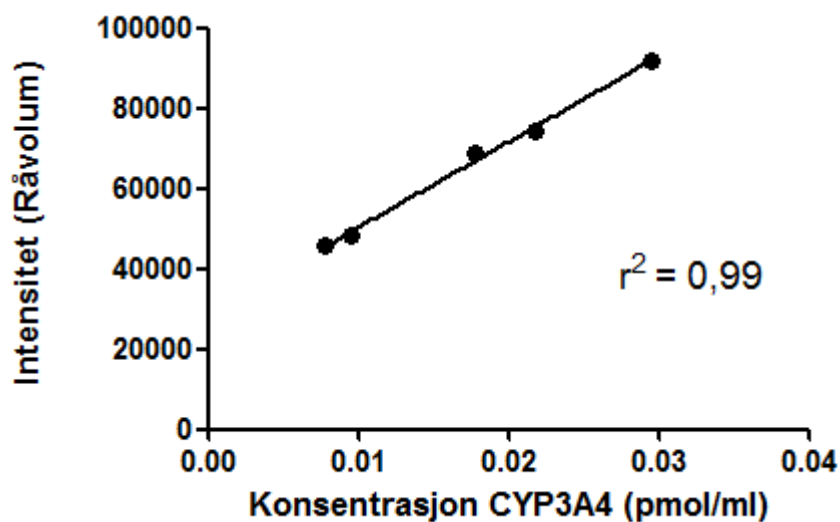
**Figur 12:** Standardrekke for rekombinante insekt-mikrosomer med CYP3A4, blottet på nitrocellulosemembran i brønner på Bio-Dot mikrofiltrasjonsapparatet, i volum på 15 µl.

Innledningsvis ble det tilsatt 50 µl av standardrekken i brønnene, men intensiteten i flekkene gav et platå øverst på standardkurven (Figur 13). Volumet ble justert ned til

15 µl og det gav en rett standardkurve med regresjonskoeffisient på 0,99 ved lineær regresjon (Figur 14).



**Figur 13:** Standardkurve for CYP3A4 ved tilsetning av 50 µl i brønnene på Bio-Dot apparatet.



**Figur 14:** Standardkurve for CYP3A4 ved tilsetning av 15 µl i brønnene på Bio-Dot apparatet. Korrelasjonen ved lineær regresjon var 0,996.

### *Fremkalling i mørkerom*

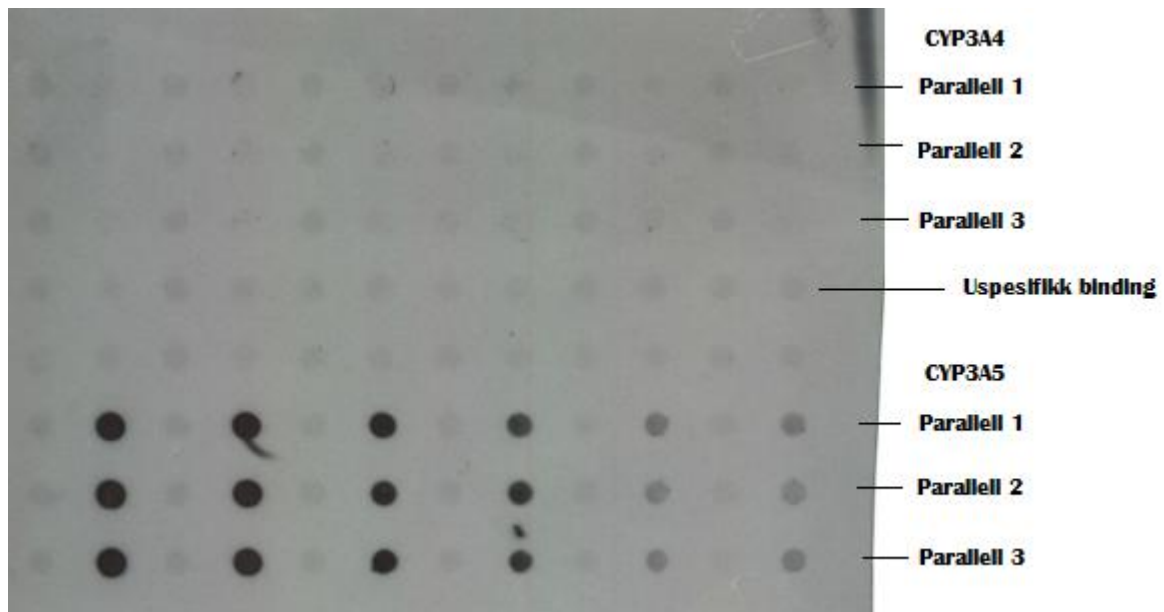
Eksponeringstiden varierte fra membran til membran. Først ble fremkallingstider på 2 og 12 minutter brukt for påvisning av CYP3A4. Underveis i studien, ble en annen batch CYP3A4 antistoff tatt i bruk og denne gav svakere fargeintensiteter i blottet, slik at eksponeringstiden måtte forlenges til 20 og 45 minutter. Primært antistoff ble ofte gjenbrukt flere ganger og nedfryst mellom hver gang. Det viste seg at fargeintensiteten i dot-blottet ble svakere etter hver bruk, og det krevdes lengre eksponeringstid ved fremkalling av film for å få tilfredsstillende intensitet i blottet.

### *Kvantifisering av CYP3A4, CYP3A5 og villin*

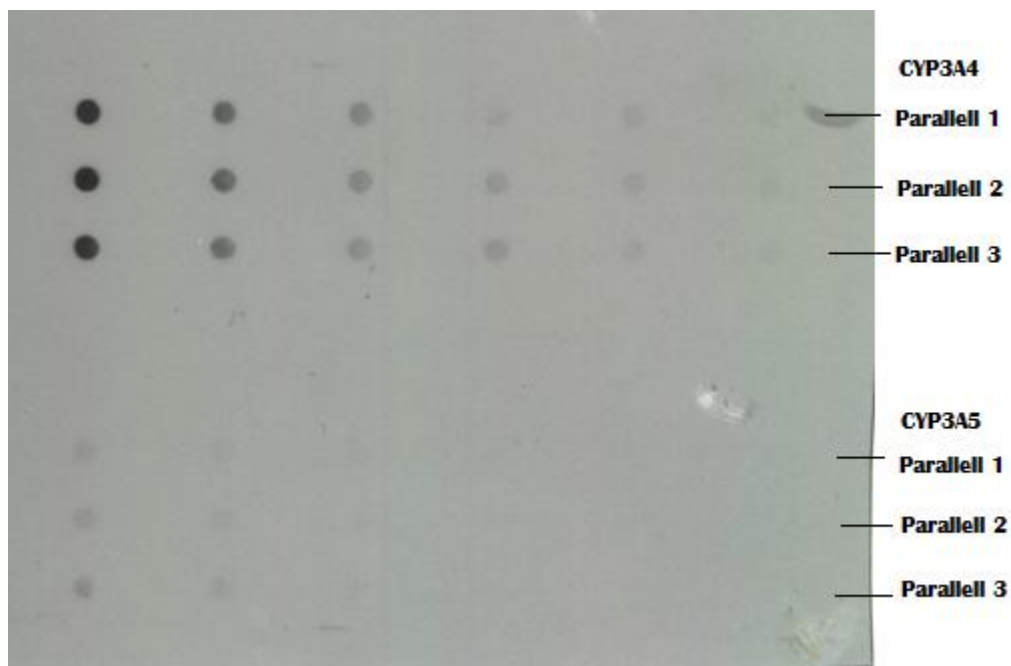
En membran påført standardrekker for CYP3A4 og CYP3A5 i 3 paralleller er presentert i figur 15 og 16. Standardrekken for CYP3A4 strekker seg fra 11,9  $\mu\text{M}$  til 58,9  $\mu\text{M}$ , og standardrekken for CYP3A5 har konsentrasjonsområdet 9,7  $\mu\text{M}$  til 98,2  $\mu\text{M}$ . Membranen ble først blottet for CYP3A5, deretter strippet, for så å bli blottet for CYP3A4. Figur 15 viser resultatene ved blotting for CYP3A5. Standardrekkene med CYP3A5 kommer tydelig frem, og antistoffet for CYP3A5 binder seg ikke til CYP3A4-enzymene, men det er en grad av uspesifikk binding i alle brønnene. Figur 16 viser samme membran som i figur 15, men her er den blottet med antistoff for CYP3A4, etter at antistoff for CYP3A5 er strippet av. CYP3A4 standardrekkene kom tydelig frem, men antistoffet viste også en svakt kryssreaktivitet mot CYP3A5. Det var derimot ingen uspesifikk binding i brønnene hvor det ikke var tilsatt prøve.

Kvantisering av CYP3A4, CYP3A5 og villin på samme membran viste seg å være komplisert, da det krevde at pasientprøvene ble fortynnet slik at de lå innen det lineære området til hver standardrekke. Ved blotting av villin på membranene hvor det var kvantifisert CYP3A4, ble flere av pasientprøvene ikke detekterbare for villin, mens noen av dem viste så høy intensitet at de trolig ligger over metningspunktet for bindingskapasitet til membranen (data ikke vist).





**Figur 15:** Membran påført standardrekker for CYP3A4 og CYP3A5 i 3 paralleller, og blottet med antistoff for CYP3A5.



**Figur 16:** Samme membran som i figur 15, påført standardrekker for CYP3A4 og CYP3A5 i 3 paralleller, men her blottet med antistoff for CYP3A4.

Mengde CYP3A4 funnet i enkelte av supernatantene utgjorde mer enn 5 % i totalt mengdeforhold (Tabell 3), og mengden ble derfor addert med mengden funnet fra reløst pellet (Tabell 5).

**Tabell 3:** Kvantitative data for estimert andel CYP3A4 i supernatant hos pasientene, angitt i %.

	Andel CYP3A4 funnet i supernatant (%)				
Pasient	Ileum	Jejunum	Magesekk	Lever	PK3
4	39,0	6,1*	21,5*	7,7*	IR
5	9,4	14,5*	14,2*	2,7*	7,9*
6	14,5*	17,7*	23,5*	1,4*	IR
7	3,9	4,4*	4,0	3,4*	6,7
8	18,9*	19,0*	8,0*	2,7*	IR
9	IR	IR	IR	IR	IR
11	22,5*	29,1*	24,5*	35,3*	13,8*
12	64,1	35,1	28,6*	24,4*	17,9*

\* Estimert fra intensiteter utenfor det lineære området på standardkurven

IR: Ikke rapportert

### 6.1.3 Validering av metoden

Analysemetodens intradag presisjon ble estimert til over 80 % ved sammenligning av intensitetene for 5 parallelle standardkurver blottet på samme membran (Tabell 4).

**Tabell 4:** Estimert intradag presisjon fra 5 parallelle standardkurver.

Standardkurve (fortynning)	Intensitet (gj.snitt $\pm$ SD)	Presisjon (%)
1:10 000	730511 $\pm$ 31101	95,7
1:15 000	569637 $\pm$ 6819	98,8
1:20 000	429725 $\pm$ 41941	90,2
1:25 000	297706 $\pm$ 40425	86,4
1:30 000	179159 $\pm$ 17903	90,0
1:35 000	143517 $\pm$ 23431	83,7
1:40 000	120059 $\pm$ 11676	90,7
1:50 000	119213 $\pm$ 23472	80,3

Interdag presisjon ble estimert ved å sammenligne estimert CYP3A4 mengde for en biopsi, fra flere dot-blott. Gjennomsnittet og standardavviket ble beregnet til  $6,9 \pm 1,3$  fmol/mg protein, og variasjonskoeffisienten var 19,4 %. Både intradag og interdag presisjon for metoden var dermed tilfredsstillende, og i tråd med retningslinjer for validering av bioanalyser (U.S Department of Health and Human Services 2001).

## 6.2 Resultater pasienter

### 6.2.1 CYP3A4

Resultater for estimerte mengder CYP3A4 i biopsiene hos pasientene er presentert i tabell 5.

Pasient 11 og 12 ble blottet på samme membran, og resultatene viser at pasient 12 har et absolutt høyere uttrykk av CYP3A4 (ileum + jejunum) enn pasient 11, henholdsvis 67,3 fmol CYP3A4/mg protein og 45,6 fmol CYP3A4/mg. Det er generelt en variasjon i kvantifiserte mengder i de ulike biopsiene. Pasient 11 har lave mengder CYP3A4 i lever, noe som også ble observert hos pasient 12, og ileum i pasient 11 har et lavere uttrykk CYP3A4 enn jejunum. I pasient 12 er mengden CYP3A4 i ileum høyere enn for både jejunum og magesekk. Mengden CYP3A4 i magesekk og lever er forholdsvis lik for pasient 11 og 12, mens mengden i PK3 er 2,8 ganger større hos pasient 12. Pasient 5 og 7 ble også blottet på samme membran, og nivået av CYP3A4 i tarm (ileum + jejunum) for pasient 5 og 7 er lignende nivået som ble funnet i pasient 11, henholdsvis 32,4, 40,3 og 45,6 fmol CYP3A4/mg protein. Hos pasient 5 er nivået av CYP3A4 i ileum og magesekk omtrent det samme, mens kvantifiserte mengder i lever og jejunum er lavere. CYP3A4 estimert i PK3 er høyest. Nivået CYP3A4 kvantifisert i de ulike biopsiene hos pasient 7 er lignende for ileum, jejunum, og PK3, mens nivået i magesekken er lavere. Pasient 5 og 7 har tilnærmet like mengder CYP3A4 i ileum og lever, men pasient 5 har høyere mengder CYP3A4 i magesekk, og lavere mengder CYP3A4 i jejunum enn pasient 7.

Pasient 6 og 8 ble blottet på samme membran, og resultatene viser generelt lave verdier av CYP3A4 i alle biopsiene for begge pasientene. Prøvene ble fortynnet for lite (1:2 og 1:8 for alle prøvene, og 1:2, 1:8 og 1:10 for leverprøvene), slik at majoriteten av intensitetene ble liggende langt over det lineære området på standardkurven. Estimaten for CYP3A4 er derfor mest sannsynlig underkvantifisert. Pasient 6 har høyere verdi av CYP3A4 i ileum og magesekk, enn i jejunum og lever. I pasient 8 er nivået høyest i jejunum, mens kvantifiserte mengder CYP3A4 er relativt lave i de resterende biopsiene. Nivået i ileum i pasient 6 er høyere enn for pasient 8, som derimot har et høyere nivå av CYP3A4 i jejunum, så summen av CYP3A4 i ileum og jejunum er lignende for de to pasientene (16,0 og 19,8 fmol/mg protein).

Kvantifiserte mengder i pasient 4 viste lavt nivå CYP3A4 for alle biopsiene og variasjonen mellom biopsiene var lav. I tarm (ileum + jejunum) ble det estimert 7,3 fmol CYP3A4/mg protein. Det må i midlertidig nevnes at det er noe usikkerhet i

estimatene, da biopsiene fra pasient 4 ble sentrifugert i flere trinn under metodeutvikling av cellefraksjoneringen. I resultatene for estimerte mengder CYP3A4 i biopsiene for pasient 9, er nivået høyest i ileum, mens det i jejunum er relativt lavt. Kvantifisert mengde i lever, er høyere enn kvantifisert mengde i magesekk. Alle intensitetene i blottet, ble liggende utenfor standardkurven, og estimert mengde CYP3A4 er derfor noe usikker. Mengder CYP3A4 estimert i ileum er likevel på nivå med kvantifiserte mengder funnet i pasient 5 og 7 (23,0 og 20,3 fmol CYP3A4/mg protein).

**Tabell 5:** Kvantitative data for estimert mengde CYP3A4 i pasientene.

	Mengde CYP3A4 i biopsiene angitt i fmol/mg protein				
Pasient	Ileum	Jejunum	Magesekk	Lever	PK3
<b>4</b>	3,7	3,6*	10,0*	3,8*	IR
<b>5</b>	23,0	9,4*	23,6*	15,0*	55,4*
<b>6</b>	10,6*	5,4*	18,1*	2,4*	IR
<b>7</b>	20,3	20,0*	7,2	17,3*	20,1
<b>8</b>	8,3*	11,5*	3,3*	1,3*	IR
<b>9</b>	21,1*	5,7*	11,2*	16,5*	IR
<b>11</b>	16,9*	28,7*	15,5*	5,7*	27,7*
<b>12</b>	38,3	29,0	10,7*	9,0*	78,9*

\* Estimert fra intensiteter utenfor lineært område for standardrekken

IR: Ikke rapportert (PK3 biopsier var ikke tatt ved tidspunkt for utførelse av forsøket)

Kvantifisering av CYP3A4 ble hovedfokus under metodeutviklingen, så CYP3A5 er ikke blitt kvantifisert i pasienter i denne oppgaven.

### 6.2.2 Villin

Det ble blottet for villin på enkelte membraner etter at de var blitt strippet for CYP3A4 antistoff. Villin lot seg detektere for noen prøver fra pasient 5, 7, 11 og 12,

og intensiteten for dem ble relatert til intensiteten for villinstandard. Ved å sammenligne PK3 for alle pasientene, er det et tydelig høyere nivå av fmol CYP3A4/rel. villin i pasient 5, 7 og 12 enn for pasient 11 (Tabell 6).

**Tabell 6:** Kvantitative data for estimerte mengde CYP3A4 i forhold til villin.

Pasient	Type biopsi	fmol CYP3A4/g biopsi (total)	Relativt forhold til villin standard	fmol CYP3A4/rel.villin	fmol CYP3A4/mg protein
5	PK3	543,1	1,6	335,8	55,4*
7	PK3	233,9	1,0	228,9	20,1
11	Ileum	233,4	2,8	84,4	16,9*
	Jejunum	175,3	1,9	92,1	28,7*
	PK3	369,2	4,1	89,5	27,7*
12	Ileum	585,7	11,1	52,7	38,3
	Jejunum	451,1	4,8	94,1	29,0
	PK3	595,3	1,3	446,0	78,9*

rel.villin tilsvarer relativt forhold til villin standard (villin-enhet)

\* Estimert på intensiteter utenfor lineært område for standardrekken

### 6.2.3 Totalprotein målinger

Ved å bruke den lineære sammenhengen i standardkurven funnet via spektrofotometrisk måling ved 595 nm bølgelengde i Wallac 1420 (Perkin Elmer) ble mengde totalprotein i alle vevsprøvene fra pasientene estimert. Resultatene viser interindividuell variasjon (Tabell 7).

**Tabell 7:** Estimert totalprotein innhold i vevsprøvene basert på lineær regresjon av standardkurve

	Totalprotein mengde for pasientene (mg protein/g biopsi)				
Pasient	Ileum	Jejunum	Magesekk	Lever	PK3
4	2,2	9	5,3	11,7	2,2
5	13,9	26,7	10,1	19,8	9,8
6	9,2	22	10,7	11,5	IR
7	12,3	9	39	10,3	11,3
8	13,3	9,7	19,7	22,3	IR
9	9,1	15,2	10	13,6	IR
11	13,8	6,1	13,8	24	13,4
12	15,3	15,5	34,2	21,2	7,5

IR: Ikke rapportert (PK3 biopsier var ikke tatt ved tidspunkt for utførelse av forsøket.)

#### 6.2.4 Farmakokinetiske data

Resultater fra deler av de farmakokinetiske studiene utført i den overordnede studien er presentert i tabell 8. Gastrisk bypass operasjon viste variabel effekt på den systemiske eksponeringen av atorvastatin syre, fra en økning på 2,3 ganger til en reduksjon på 2,9 ganger (median ratio 1,3) (Skottheim, Stormark et al. 2009). Pasient

4, 6 og 11 hadde alle en høy eksponering før operasjonen, og disse pasientene fikk en lavere eksponering av atorvastatin syre etter gastrisk bypass.  $AUC_{(0-8)}$  ratio for disse var  $0,4 \pm 0,07$  og det tilsvarer en gjennomsnittlig nedgang på 2,6 ganger. Pasient 5, 7, 8, 9 og 12 hadde en generelt lav systemisk eksponering av atorvastatin syre før operasjonen, og alle disse fikk en økning i  $AUC_{(0-8)}$  etter at gastrisk bypass var utført.  $AUC_{(0-8)}$  ratio for disse var  $1,8 \pm 0,49$ .

**Tabell 8:** Farmakokinetiske data for pasientpopulasjonen. Den systemiske eksponeringen av atorvastatin syre er vist som før (pre) og etter (post) operasjonen, i tillegg til 2 år etter operasjonen (PK3)  $AUC_{(0-8)}$  er angitt som ng·h/ml. Forandringen i  $AUC_{(0-8)}$  etter operasjonen er vist som ratio.

Pasient (rekode)	Dose (mg)	$AUC_{(0-8)}$ (ng·h/ml)			$AUC_{(0-8)}$ (ng·h/ml)		
		Pre	Post	Ratio	PK3	Ratio post	Ratio pre
4	80	315	107	0,3	IR	IR	IR
5	80	35	61	1,7	57	0,9	1,6
6	40	138	65	0,5	IR	IR	IR
7	20	19	21	1,1	25	1,2	1,4
8	20	18	38	2,2	IR	IR	IR
9	20	9	21	2,3	IR	IR	IR
11	40	163	63	0,4	65	1,0	0,4
12	40	37	54	1,5	37	0,7	1,0
Gj.snitt	43	92	54	1	46	1	1
Min.	20	9	21	0	25	1	0
Maks.	80,0	315,4	106,8	2,3	64,7	1,2	1,6
Median	40	37	54	1	46	1	1

IR:Ikke rapportert



## 7. DISKUSJON

### 7.1 Overveielse av metode

#### 7.1.1 Cellefraksjonering

##### *Homogenisering*

Homogeniseringen ble optimalisert ved bruk av Precellys 24, fremfor mer tradisjonelt utstyr, ved at den angivelig øker reproduserbarheten og reduserer svinn (Bertin 2009). Teknologien bak Precellys 24 er relativt ny (2007) og det finnes lite dokumentasjon rundt bruken av den, men en studie utført i 2008, på ulike protokoller for ekstraksjon fra vev til NMR- og MS-baserte analyser, påpekte optimaliseringsegenskapene til Precellys 24 (Wu, Southam et al.). Det foreligger noen protokoller for homogenisering med Precellys 24, men få av dem beskriver håndtering av humant vev (Bertin 2009). Biopsiene fra de ulike vevstypene i denne studien varierte i størrelse og dybde, og homogeniseringen ble derfor ikke like fullstendig for alle prøvene, ved det bestemte homogeniseringsprogrammet. Spesielt gjaldt dette store biopsier. Det er mulig at lengre homogeniseringsprogram kunne økt homogenisiteten, men under homogeniseringsprosessen skapes varme, og varmen kan denaturere og bryte ned CYP-enzymene. Det ble observert en svak nedgang i detektert mengde CYP3A4 ved homogenisering over 160 sekunder under stresstesting. Denne reduksjonen i CYP3A4 konsentrasjon kan være tegn på at enzymene ødelegges av varmeutviklingen som fremkommer ved homogenisering over lengre tid. Mellom ristesyklusene i Precellys 24, er det mulig å sette pausen til 60 sekunder, men dette er ikke tilstrekkelig til å nedkjøle prøvene. På bakgrunn av dette er det vanskelig å si hvorvidt det er bedre å bruke et standardisert program for alle vevsprøvene, eller å tilpasse program til hver biopsi. I det videre arbeidet kan det vurderes å benytte manuell nedkjøling av homogenatet under homogeniseringsprosessen.

### *Sentrifugering*

Det kan være vanskelig å forutse sedimenteringsegenskaper fra et vev til et annet. Dimensjoner og tetthet varierer for organellene i de ulike vevstypene. For eksempel kan vesikler fra endoplasmatisk retikulum variere fra 0,05  $\mu\text{m}$  til 0,3  $\mu\text{m}$  (Graham 1984). Mikrosomene som dannes ved homogenisering har også ulike sedimenteringsegenskaper. Mikrosomer med ribosomer er dannet fra ru ER. Mikrosomer fra glatt ER, mangler ribosomene, men består også av deler av plasma membranen, Golgi apparatus, endosomer og mitokondrier. Ratio for mikrosomtypene vil variere mellom ulike vev. Mikrosomer fra lever vil hovedsakelig være av lav tetthet, fordi hepatocytene inneholder unormalt mye glatt ER (Alberts 2002). Tettheten på mikrosomene fra glatt ER er mindre enn for mikrosomene fra ru ER, og de har en tendens til å legge seg som et løst pakket lag over et mer tettpakket lag med ru mikrosomer (Graham 1984; Alberts 2002). Det er derfor mulig et løst lag med glatt ER over pelleten ble dratt av med pipettespissen ved fjerning av supernatant i denne studien, og at det derfor ble påvist CYP3A4 i supernatanten.

En blanding av ufullstendig homogenisering og fraksjonering kan altså være årsak til at CYP3A4 ble gjenfunnet i flere fraksjoner i forsøket med flere sentrifugeringstrinn. På bakgrunn av at dette var en kvantitativ analyse, og ikke en studie av funksjonalitet, ble minimalisering av svinn under opparbeidelsesprosessen prioritert fremfor renhet i fraksjonen, og homogenatet ble kun sentrifugert én gang. En fordel med 1-trinns-fraksjonering var i midlertidig at små rester av vev oppdaget ved reløsning av pelletter kunne homogeniseres med pistillen i Dounce homogenisatoren. Effektiviteten og grad av fragmentering i en homogeniseringsprosess avhenger av antall pumpinger med pistillen, kraften den pumpes med, hastigheten på rotasjonen av pistillen, pistillens avstand fra beholderens vegg og størrelse og mengden på materiale som skal homogeniseres. Ettersom prosessen gjøres for hånd er den ikke nøyaktig reproducerbar (Graham 1984), og dette bidro til at ikke alle suspensjonene med reløst pellet var like homogene. I en studie utført av Lown et al. ble det vist at  $> 80\%$  av CYP3A4 enzymene ble tapt under opparbeidelse av S9 fraksjon ved differensiell fraksjonering sammenlignet med homogenat (1994). Det er derfor mulighet for at

blotting av homogenat, uten noe form for sentrifugering, kan være hensiktsmessig for å øke recovery av CYP3A4.

### 7.1.2 Kvantifisering av proteiner

Linearitet og presisjon er sentrale parametre i valideringen av en analysemetode, og både interdag og intradag presisjon i Western blott metoden var tilfredsstillende, og standardkurvene viste høy grad av linearitet. God interdag presisjon tillater sammenligning av kvantitative mengder på tvers av membraner. Western blott betegnes generelt som en semi-kvantitativ metode, men til kvantitative relateringer innad i en pasientpopulasjon kan den være godt egnet.

Ifølge instruksjonsmanualen til Bio-Dot apparatet skulle det tilsettes prøve i minst mulig volum i brønnene. Innledningsvis ble det tilsatt 50 µl av standardrekken, men det gav en metning av bindingskapasiteten til membranen i de høyeste konsentrasjonene, og intensiteten i flekkene gav et platå øverst på standardkurven (Figur 13), så for å unngå en slik metning, ble volumet justert ned til 15 µl. Dette gav en rett standardkurve med regresjonskoeffisient på 0,99 ved lineær regresjon (Figur 14).

Primært antistoff ble gjenbrukt flere ganger, men viste seg å gi svakere blott etter hver gang. Det ble derfor satt en øvre grense for gjenbruk av primært antistoff på 3 ganger. I slutten av studien ble det også tatt i bruk ny fremkaller og fiks (Kodak GBX røntgenfremkaller og røntgenfiksator) som gav mer intense bilder av blottene. Ved videre bruk av disse bør eksponeringstiden justeres.

Det ble oppdaget uspesifikk binding i tomme brønner både for CYP3A4 og CYP3A5 antistoffet, og den ble forsøkt eliminert ved å bruke negativ kontroll. Intensiteten funnet for kontrollen ble observert høyere enn bindingen av antistoff i brønnene med de mest fortynnede prøvene, og kunne derfor ikke brukes likevel. Bakgrunnen for den uspesifikke bindingen er uvisst, men det er mulig den melkebaserte blotto-løsningen ikke blokkerte nitrocellulosemembranen tilstrekkelig. På membraner blottet for både CYP3A4 og CYP3A5 ble det for antistoffet mot CYP3A4 oppdaget en kryss-

reaktivitet mot CYP3A5. Antistoffene skal i utgangspunktet være selektive, så det er mulig strippeprosessen kan endre molekylstrukturen i CYP-enzymene.

Det ble brukt en hp Scanjet 5590 skanner og skanningsprogrammet HP Photo Imaging til å overføre bilde av nitrocellulosemembranen til en TIFF-fil. TIFF-filen ble så importert inn i GeneTools for analyse. I henhold til God laboratorium praksis, bør et bilde overføres til GeneTools programmet fra et Gel doc (gel documentation) apparat, spesielt laget for GeneTools analyse. Et Gel doc apparat ble forsøkt brukt, men på grunn av tekniske feil ved apparatet kunne det ikke brukes til membraner av den størrelsen brukt i Bio-Dot apparatet.

### 7.1.3 Fremtidige betraktninger for metode

- Homogenisering bør optimaliseres og hele homogenat bør blottes i stedet for fraksjoner
- En annen blokkeringsløsning enn blotto bør forsøkes, for å redusere uspesifikk binding.
- For å oppnå GLP, og dermed få en mer nøyaktig kvantitativ bestemmelse av proteinene, bør Gel-doc brukes fremfor skanner.
- CYP3A5 og villin bør kvantifiseres for å få et mer korrekt bilde av sammenhengen mellom CYP-metabolisme og biotilgjengeligheten av atorvastatin ved gastrisk bypass.

## 7.2 Kvantitative resultater av CYP3A4 og villin, og link til farmakokinetisk profil til pasientene.

Pasient 4, 6 og 11 er alle pasienter som fikk estimert lavere CYP3A4 nivåer i tynntarm enn pasient 12 (Tabell 5). Disse pasientene hadde høy systemisk eksponering før operasjonen, men fikk en gjennomsnittlig nedgang på 2,6 ganger etter gastrisk bypass (Tabell 8) (Skottheim, Stormark et al. 2009). Pasient 12 med sitt høyere nivå av CYP3A4, hadde lav  $AUC_{(0-8)}$  før operasjonen og fikk høyere  $AUC_{(0-8)}$  etter gjennomført gastrisk bypass (Skottheim, Stormark et al. 2009). Dette kan indikere at et høyt uttrykk av CYP3A4 før operasjonen, er mer avgjørende for

effekten på biotilgjengeligheten enn et redusert absorpsjonsareal er, ettersom den metabolske eliminasjonen blir vesentlig redusert ved en gastrisk bypass. Ved et lavere uttrykk av CYP3A4, kan den reduserte absorpsjonen være av større betydning for AUC, enn hva redusert metabolisme er, fordi metabolismen er lav i utgangspunktet.

Pasient 6 og 8 har generelt lave verdier av CYP3A4 i tarm, men pasient 8 har et høyere nivå i jejunum enn pasient 6 (henholdsvis 11,5 og 5,4 fmol CYP3A4/mg protein) (Tabell 5). Jejunum blir forbikoblet ved gastrisk bypass, og dette kan være grunnen til at pasient 8 får en høyere  $AUC_{(0-8)}$  etter gastrisk bypass. Pasient 6 derimot får en lavere  $AUC_{(0-8)}$  etter operasjonen, selv om uttrykket av CYP3A4 i ileum tilsvarer uttrykket i pasient 8, men deler av ileum blir beholdt ved gastrisk bypass, så den metaboliske eliminasjonen der, vil ikke bli like påvirket. Pasient 4 har tydelig høyere  $AUC_{(0-8)}$  enn de andre pasientene før operasjonen (315 ng·h/ml), og CYP3A4 nivået estimert i biopsiene fra denne pasienten var markert lavere enn de andre pasientene (Tabell 5). Det er i denne sammenheng interessant at denne pasienten fikk en redusert AUC-ratio (3 ganger) (Tabell 8, (Skottheim, Stormark et al. 2009)). Det er noe usikkerhet i estimatene for pasient 4, men det er likevel en hentydning til at absorpsjonsarealet er mer avgjørende for AUC enn CYP-metabolisme, i personer med et lavere uttrykk av CYP3A4. Pasient 9 hadde lavest  $AUC_{(0-8)}$  av alle pasientene før operasjonen, og var den pasienten som fikk høyest  $AUC_{(0-8)}$ -ratio (Tabell 8). Estimert mengde CYP3A4 i tarm var på nivå med pasient 5 og 7, som begge hadde middels uttrykk. Selv om resultatene fra kvantifiseringen av CYP3A4 i pasientene korrelerer i noen grad med endringen observert i  $AUC_{(0-8)}$ , er det for få pasienter involvert i studien til at ekstrapolering til generell populasjon kan gjøres direkte (Skottheim, Stormark et al. 2009).

Studien undersøkte endringer i AUC av atorvastatin som følge av en gastrisk bypass operasjon, og det var derfor fordelaktig å sammenligne kvantifisert CYP3A4 i tarm (ileum og jejunum) før operasjonen, mellom pasientene. Mengder CYP3A4 estimert i magesekk og lever viste variasjon mellom pasientene. I lever ble det i flere pasienter, utenom pasient 4 og 6, kvantifisert relativt mindre mengder av CYP3A4 i forhold til i tynntarm (ileum og jejunum). Disse resultatene strider imot funn om at det totale

innhold CYP3A4 er lite i tarm, i forhold til lever (Paine, Khalighi et al. 1997), men lignende resultater har vært rapportert i en tidligere studie hvor det ble funnet 3 ganger mer CYP3A4 i homogenat fra tarm, enn i fra lever (von Richter, Burk et al. 2004). Studier har indikert at CYP-enzymmer er distribuert jevnt i leveren (Watkins, Murray et al. 1990; Debri, Boobis et al. 1995) så biopsidybde skal i utgangspunktet ikke ha noe betydning her. Nivå av CYP-enzymmer i lever har betydning for biotilgjengelighet av legemidler, men i forhold til AUC ratio av atorvastatin etter en gastrisk bypass operasjon vil endringer i tynntarm og magesekk være viktigere parametre enn lever. Betydelig estimert mengde av CYP3A4 i magesekk hos pasientene, er interessant, selv om lite legemidler absorberes i magesekken sammenlignet med i tynntarm. Det er likevel ikke utelukket at CYP-metabolisme i magesekkepitel kan spille en rolle i pasienter som har gjennomgått gastrisk bypass, hvor det er endring i GI fysiologi så vel som pH.

Resultatene har vist stor interindividuell variasjon i uttrykk av CYP3A4, noe som også tidligere studier har påvist (Paine, Khalighi et al. 1997). Flere studier er utført hvor det er kvantifisert CYP-enzymmer både i tynntarm og lever. Shimada et al. fant at det var  $96 \pm 51$  pmol CYP3A4/mg protein i mikrosomer opparbeidet fra 60 leverbiopsier (1994). Westlind-Johnsson fant 155,8 pmol CYP3A4/mg protein ved Western blotting, i en studie av levermikrosomer opparbeidet fra 46 humane biopsier (2003). Paine et al. kvantifiserte nylig mikrosomer ved Western blotting, opparbeidet ved skraping av mukosa i duodenum og jejunum hos 31 donorer, og fant  $58 \pm 1,0$  CYP3A4 pmol/mg protein (2006). Paine et al. utførte også en studie i 1997 hvor hele CYP3A underfamilien ble kvantifisert til 17 pmol/mg protein i ileum og 23 pmol/mg protein i jejunum ved Western blotting, fra skraping av mukosa i 20 humane donorer. Studien viste stor variasjon av nivåer av CYP3A4, og mengde CYP3A4 proteiner varierte fra 2,1 til 98 og 1,9 til 59,5 pmol/mg protein i henholdsvis duodenum, jejunum og ileum (1997). Kvantitative mengder CYP3A4 funnet i denne oppgaven var betydelig lavere enn hva de overnevnte studiene viser. For pasientene med sikreste kvantitative resultater, pasient 5, 7, 11 og 12, var gjennomsnittet  $24,6 \pm 10$ ,  $21,8 \pm 9,0$ ,  $14,3 \pm 7,0$ ,  $11,8 \pm 5,0$ , og  $45,5 \pm 27,0$  fmol CYP3A4/mg protein i henholdsvis ileum, jejunum, magesekk, lever og PK3. Årsaken til betydelig lavere

mengde CYP3A4 estimert i denne oppgaven i forhold til andre studier, kan blant annet være utgangsmaterialet som mikrosomene er opparbeidet fra. CYP-enzymene i tynntarm i de nevnte studiene, er kvantifisert fra mukosale skrapinger. Ettersom CYP-enzymene er uttrykket i enterocytene på villiene (Kolars, Lown et al. 1994), er det naturlig at en skraping av mukosa i tynntarm vil gi større kvantitative verdier av CYP-enzymene, enn hva en biopsi av tarm vil gi. PK3 i denne studien er oppnådd ved gastroskopi, og det er betydelig mer CYP-enzymene i noen av de biopsiene, enn for biopsiene tatt under gastrisk bypass operasjon. Uttrykket av villin vil kunne normalisere pasientprøvene (Lown, Bailey et al. 1997), og mengde CYP3A4 kvantifisert i forhold til villin for alle pasientene, kunne gi et mer korrekt sammenligningsgrunnlag på tvers av både pasienter og studier hvor det er normalisert med villin. Det er større variasjon i nivået av CYP3A4 mellom pasientene relatert til villinet, enn hva som er funnet relatert til proteinmengden (pkt. 6.2.1), og ettersom beregninger med villinet tar hensyn til hvor dypt biopsien er tatt, er det grunnlag for å studere dette videre. Andre metodemessige forskjeller som løsninger, inkubasjonstider med antistoff, og kvantifiseringsprogram kan også være årsaker til lavere kvantitative verdier i denne studien.

Atorvastatin er, i tillegg til å bli metabolisert av CYP3A4, et substrat for CYP3A5 og P-gp (Wang, Casciano et al. 2001; Park, Kim et al. 2008), så uttrykket av disse bør undersøkes nærmere før endelige konklusjoner kan trekkes angående effekten av en gastrisk bypass operasjon på bio-tilgjengeligheten til atorvastatin.

## 8. KONKLUSJON

Det ble utviklet metoder for homogenisering av tarm- og leverbiopsier og kvantifisering av CYP3A4 og CYP3A5 i prøvene ved bruk av Western blott. Metoden for kvantifisering av CYP3A4 og CYP3A5 viste god presisjon og lav interdag og intradag variasjon.

Mengder CYP3A4 ble kvantifisert i biopsier fra magesekk, tarm og lever fra pasienter som hadde gjennomgått en gastrisk bypass operasjon. Nivåene for CYP3A4 i de enkelte pasientene ble relatert til individuelle AUC-verdier for atorvastatin, for å se om det var noe sammenheng mellom uttrykket av CYP3A4 og endringer i den farmakokinetiske profilen av atorvastatin etter en gastrisk bypass operasjon. De preliminare dataene hentydet til at det er en viss sammenheng mellom nivå av CYP3A4 i tarm og endringer i biotilgjengeligheten av atorvastatin som følge av en gastrisk bypass operasjon. De foreløpige resultatene tyder altså på at gastrisk bypass operasjon ikke kun reduserer absorpsjonsarealet i tarm, men også kan redusere den intestinale first pass metabolismen via CYP3A4.



## 9. KILDELISTE

- Aasheim, E. T., T. Mala, et al. (2007). "[Surgical treatment of morbid obesity]." Tidsskr Nor Lægeforen **127**(1): 38-42.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2002). Molecular Biology of the Cell. New York, Garland Science.
- Ayrton, A. and P. Morgan (2008). "Role of transport proteins in drug discovery and development: a pharmaceutical perspective." Xenobiotica **38**(7-8): 676-708.
- Backman, J. T., H. Luurila, et al. (2005). "Rifampin markedly decreases and gemfibrozil increases the plasma concentrations of atorvastatin and its metabolites." Clin Pharmacol Ther **78**(2): 154-67.
- Badman, M. K. and J. S. Flier (2005). "The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars." Science **307**(5717): 1909-14.
- Beermann, B., K. Hellstrom, et al. (1973). "The gastrointestinal absorption of digoxin in seven patients with gastric or small intestinal reconstructions." Acta Med Scand **193**(4): 293-7.
- Bertin, T. (2009). "Precellys Homepage." from [http://www.precellys.com/en/applications/general\\_information/](http://www.precellys.com/en/applications/general_information/).
- Black, A. E., R. N. Hayes, et al. (1999). "Metabolism and excretion of atorvastatin in rats and dogs." Drug Metab Dispos **27**(8): 916-23.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Buchwald, H. (2005). "Bariatric surgery for morbid obesity: health implications for patients, health professionals, and third-party payers." J Am Coll Surg **200**(4): 593-604.
- Buchwald, H. (2005). "The future of bariatric surgery." Obes Surg **15**(5): 598-605.
- Buchwald, H., Y. Avidor, et al. (2004). "Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis." JAMA **292**(14): 1724-37.
- Castle, J. D. (2004). "Overview of cell fractionation." Curr Protoc Protein Sci **Chapter 4**: Unit 4 1.
- Cauffiez, C., J. M. Lo-Guidice, et al. (2004). "First report of a genetic polymorphism of the cytochrome P450 3A43 (CYP3A43) gene: identification of a loss-of-function variant." Hum Mutat **23**(1): 101.
- Chan, L. M., S. Lowes, et al. (2004). "The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability." Eur J Pharm Sci **21**(1): 25-51.
- Costa, J., M. Borges, et al. (2006). "Efficacy of lipid lowering drug treatment for diabetic and non-diabetic patients: meta-analysis of randomised controlled trials." BMJ **332**(7550): 1115-24.
- Daly, A. K. (2006). "Significance of the minor cytochrome P450 3A isoforms." Clin Pharmacokinet **45**(1): 13-31.
- Debri, K., A. R. Boobis, et al. (1995). "Distribution and induction of CYP3A1 and CYP3A2 in rat liver and extrahepatic tissues." Biochem Pharmacol **50**(12): 2047-56.

- Deitel, M. (2003). "Overweight and obesity worldwide now estimated to involve 1.7 billion people." Obes Surg **13**(3): 329-30.
- Dickerson, L. M. and P. J. Carek (2000). "Drug therapy for obesity." Am Fam Physician **61**(7): 2131-8, 2143.
- Elder, K. A. and B. M. Wolfe (2007). "Bariatric surgery: a review of procedures and outcomes." Gastroenterology **132**(6): 2253-71.
- Fontaine, K. R., D. T. Redden, et al. (2003). "Years of life lost due to obesity." JAMA **289**(2): 187-93.
- Ginsberg, H. N. (1998). "Effects of statins on triglyceride metabolism." Am J Cardiol **81**(4A): 32B-35B.
- Goodman, L. S., A. Gilman, et al. (2006). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. New York, McGraw-Hill.
- Goodman, L. S., A. Gilman, et al. (1996). Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. New York, McGraw-Hill.
- Graham, J. (1984). Centrifugation, A Practical Approach. Oxford, England, IRL Press Limited.
- Graham, J. (1984). Isolation of Subcellular Organelles and Membranes. Centrifugation, A practical Approach D. Rickwood. Oxford, England, IRL Press Limited: 162-182.
- Grodos, D. and R. Tonglet (1994). "Scandinavian simvastatin study (4S)." Lancet **344**(8939-8940): 1768.
- Groholt, E. K., H. Stigum, et al. (2008). "Overweight and obesity among adolescents in Norway: cultural and socio-economic differences." J Public Health (Oxf) **30**(3): 258-65.
- Guengerich, F. P. (1999). "Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism." Annu Rev Pharmacol Toxicol **39**: 1-17.
- Guengerich, F. P. and T. Shimada (1991). "Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes." Chem Res Toxicol **4**(4): 391-407.
- Guyton, J. R. (2006). "Benefit versus risk in statin treatment." Am J Cardiol **97**(8A): 95C-97C.
- Haufrond, V., M. Mourad, et al. (2004). "The effect of CYP3A5 and MDR1 (ABCB1) polymorphisms on cyclosporine and tacrolimus dose requirements and trough blood levels in stable renal transplant patients." Pharmacogenetics **14**(3): 147-54.
- Hjelmsaeth, J., D. Hofso, et al. (2007). "[Life-long treatment of morbid obesity]." Tidsskr Nor Laegeforen **127**(18): 2410-2.
- Igel, M., T. Sudhop, et al. (2001). "Metabolism and drug interactions of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A-reductase inhibitors (statins)." Eur J Clin Pharmacol **57**(5): 357-64.
- Isoherranen, N., S. R. Ludington, et al. (2008). "The influence of CYP3A5 expression on the extent of hepatic CYP3A inhibition is substrate-dependent: an in vitro-in vivo evaluation." Drug Metab Dispos **36**(1): 146-54.
- Jacobsen, W., B. Kuhn, et al. (2000). "Lactonization is the critical first step in the disposition of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitor atorvastatin." Drug Metab Dispos **28**(11): 1369-78.

- Kantola, T., K. T. Kivisto, et al. (1998). "Effect of itraconazole on the pharmacokinetics of atorvastatin." Clin Pharmacol Ther **64**(1): 58-65.
- Kearney, A. S., L. F. Crawford, et al. (1993). "The interconversion kinetics, equilibrium, and solubilities of the lactone and hydroxyacid forms of the HMG-CoA reductase inhibitor, CI-981." Pharm Res **10**(10): 1461-5.
- Kolars, J. C., K. S. Lown, et al. (1994). "CYP3A gene expression in human gut epithelium." Pharmacogenetics **4**(5): 247-59.
- Lamba, J. K., Y. S. Lin, et al. (2002). "Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism." Adv Drug Deliv Rev **54**(10): 1271-94.
- Lau, Y. Y., Y. Huang, et al. (2007). "effect of OATP1B transporter inhibition on the pharmacokinetics of atorvastatin in healthy volunteers." Clin Pharmacol Ther **81**(2): 194-204.
- Lechevrel, M., A. G. Casson, et al. (1999). "Characterization of cytochrome P450 expression in human oesophageal mucosa." Carcinogenesis **20**(2): 243-8.
- Lennernas, H. (2003). "Clinical pharmacokinetics of atorvastatin." Clin Pharmacokinet **42**(13): 1141-60.
- Limited, G. S. and G. W. I. Estate (2009). Dounce Homogenisator. D. Homogenisator. Bedfordshire, England.
- Lin, J. H. and A. Y. Lu (2001). "Interindividual variability in inhibition and induction of cytochrome P450 enzymes." Annu Rev Pharmacol Toxicol **41**: 535-67.
- Lin, Y. S., A. L. Dowling, et al. (2002). "Co-regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and contribution to hepatic and intestinal midazolam metabolism." Mol Pharmacol **62**(1): 162-72.
- Lindahl, A., B. Persson, et al. (1999). "Surface activity and concentration dependent intestinal permeability in the rat." Pharm Res **16**(1): 97-102.
- Lindell, M., M. O. Karlsson, et al. (2003). "Variable expression of CYP and Pgp genes in the human small intestine." Eur J Clin Invest **33**(6): 493-9.
- Lown, K. S., D. G. Bailey, et al. (1997). "Grapefruit juice increases felodipine oral availability in humans by decreasing intestinal CYP3A protein expression." J Clin Invest **99**(10): 2545-53.
- Lown, K. S., J. C. Kolars, et al. (1994). "Interpatient heterogeneity in expression of CYP3A4 and CYP3A5 in small bowel. Lack of prediction by the erythromycin breath test." Drug Metab Dispos **22**(6): 947-55.
- Miller, A. D. and K. M. Smith (2006). "Medication and nutrient administration considerations after bariatric surgery." Am J Health Syst Pharm **63**(19): 1852-7.
- Nebert, D. W. and D. W. Russell (2002). "Clinical importance of the cytochromes P450." Lancet **360**(9340): 1155-62.
- Paine, M. F., H. L. Hart, et al. (2006). "The human intestinal cytochrome P450 "pie"." Drug Metab Dispos **34**(5): 880-6.
- Paine, M. F., M. Khalighi, et al. (1997). "Characterization of interintestinal and intrainestinal variations in human CYP3A-dependent metabolism." J Pharmacol Exp Ther **283**(3): 1552-62.
- Pang, K. S. (2003). "Modeling of intestinal drug absorption: roles of transporters and metabolic enzymes (for the Gillette Review Series)." Drug Metab Dispos **31**(12): 1507-19.

- Park, D. M., D. D. Shah, et al. (2009). "Disposition of temozolomide in a patient with glioblastoma multiforme after gastric bypass surgery." J Neurooncol.
- Park, J. E., K. B. Kim, et al. (2008). "Contribution of cytochrome P450 3A4 and 3A5 to the metabolism of atorvastatin." Xenobiotica **38**(9): 1240-51.
- Patki, K. C., L. L. Von Moltke, et al. (2003). "In vitro metabolism of midazolam, triazolam, nifedipine, and testosterone by human liver microsomes and recombinant cytochromes p450: role of cyp3a4 and cyp3a5." Drug Metab Dispos **31**(7): 938-44.
- Prueksaritanont, T., L. M. Gorham, et al. (1997). "In vitro metabolism of simvastatin in humans [SBT]identification of metabolizing enzymes and effect of the drug on hepatic P450s." Drug Metab Dispos **25**(10): 1191-9.
- Prueksaritanont, T., R. Subramanian, et al. (2002). "Glucuronidation of statins in animals and humans: a novel mechanism of statin lactonization." Drug Metab Dispos **30**(5): 505-12.
- Prueksaritanont, T., C. Tang, et al. (2002). "Effects of fibrates on metabolism of statins in human hepatocytes." Drug Metab Dispos **30**(11): 1280-7.
- Prueksaritanont, T., J. J. Zhao, et al. (2002). "Mechanistic studies on metabolic interactions between gemfibrozil and statins." J Pharmacol Exp Ther **301**(3): 1042-51.
- Rang, H. P. (2003). Pharmacology. Edinburgh, Churchill Livingstone.
- Rodriguez-Antona, C. and M. Ingelman-Sundberg (2006). "Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer." Oncogene **25**(11): 1679-91.
- Rogers, C. C., R. R. Alloway, et al. (2008). "Pharmacokinetics of mycophenolic acid, tacrolimus and sirolimus after gastric bypass surgery in end-stage renal disease and transplant patients: a pilot study." Clin Transplant **22**(3): 281-91.
- Sever, P. S., B. Dahlof, et al. (2003). "Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial--Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial." Lancet **361**(9364): 1149-58.
- Shimada, T., H. Yamazaki, et al. (1994). "Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians." J Pharmacol Exp Ther **270**(1): 414-23.
- Skottheim, I. B., K. Stormark, et al. (2009). "Significantly altered systemic exposure of atorvastatin acid following gastric bypass surgery in morbidly obese patients." Clin Pharmacol Ther **In press**.
- Stern, R. H., B. B. Yang, et al. (2000). "Pharmacodynamics and pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of atorvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor." J Clin Pharmacol **40**(6): 616-23.
- Takano, M., R. Yumoto, et al. (2006). "Expression and function of efflux drug transporters in the intestine." Pharmacol Ther **109**(1-2): 137-61.
- U.S Department of Health and Human Services, F. a. D. a., Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM). (2001). "Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation." from <http://www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.htm>.

- Victor, A., V. Odland, et al. (1987). "Oral contraceptive absorption and sex hormone binding globulins in obese women: effects of jejunoileal bypass." Gastroenterol Clin North Am **16**(3): 483-91.
- von Richter, O., O. Burk, et al. (2004). "Cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein expression in human small intestinal enterocytes and hepatocytes: a comparative analysis in paired tissue specimens." Clin Pharmacol Ther **75**(3): 172-83.
- Wang, E., C. N. Casciano, et al. (2001). "HMG-CoA reductase inhibitors (statins) characterized as direct inhibitors of P-glycoprotein." Pharm Res **18**(6): 800-6.
- Watkins, P. B., S. A. Murray, et al. (1990). "Distribution of cytochromes P-450, cytochrome b5, and NADPH-cytochrome P-450 reductase in an entire human liver." Biochem Pharmacol **39**(3): 471-6.
- Westlind-Johnsson, A., S. Malmbo, et al. (2003). "Comparative analysis of CYP3A expression in human liver suggests only a minor role for CYP3A5 in drug metabolism." Drug Metab Dispos **31**(6): 755-61.
- Widmaier, E. P., H. Raff, et al. (2004). Vander, Sherman, & Luciano's Human physiology: the mechanisms of body function. Boston, McGraw-Hill Higher Education.
- Wilkinson, G. R. (2005). "Drug metabolism and variability among patients in drug response." N Engl J Med **352**(21): 2211-21.
- Williams, D. and J. Feely (2002). "Pharmacokinetic-pharmacodynamic drug interactions with HMG-CoA reductase inhibitors." Clin Pharmacokinet **41**(5): 343-70.
- World Health Organization. (2006, 10.04.2009). "BMI classification." Retrieved 04.10, 2009, from [http://www.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro\\_3.html](http://www.who.int/bmi/index.jsp?introPage=intro_3.html).
- Wrighton, S. A., W. R. Brian, et al. (1990). "Studies on the expression and metabolic capabilities of human liver cytochrome P450III<sub>A5</sub> (HLp3)." Mol Pharmacol **38**(2): 207-13.
- Wrighton, S. A. and J. C. Stevens (1992). "The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism." Crit Rev Toxicol **22**(1): 1-21.
- Wu, H., A. D. Southam, et al. (2008). "High-throughput tissue extraction protocol for NMR- and MS-based metabolomics." Anal Biochem **372**(2): 204-12.
- Wu, X., L. R. Whitfield, et al. (2000). "Atorvastatin transport in the Caco-2 cell model: contributions of P-glycoprotein and the proton-monocarboxylic acid co-transporter." Pharm Res **17**(2): 209-15.
- Zheng, H. X., Y. Huang, et al. (2009). "Elucidating rifampin's inducing and inhibiting effects on glyburide pharmacokinetics and blood glucose in healthy volunteers: unmasking the differential effects of enzyme induction and transporter inhibition for a drug and its primary metabolite." Clin Pharmacol Ther **85**(1): 78-85.

## **10. VEDLEGG**

- I PASIENTTABELLER MED ESTIMATER FOR CYP3A4
- II WESTERN BLOTT METODE
- III ABSTRAKT OM OPPGAVEN

## WESTERN BLOTT METODE

BIO RAD: Bio-Dot Instruction Manual, Section 3; Bio-Dot Assembly

1. Vask og tørk Bio-Dot apparatet
2. Sett sammen apparatet som anvist i heftet
3. Bruk alltid hansker når du håndterer membranen. Klipp til Nitrocellulose membranen og fukt den i Tris-buffered Saline (TBS) i minimum 10 min. (ta prøver ut av frysen) Fjern så membranen fra fukteløsningen og la den renne litt av seg mot et papir før den legges på Sealing gasket. Membranen bør ikke stikke utfor apparatet. Fjern luftbobler.
4. Sett på siste delen av apparatet og fest skruene. To og to av gangen, skruene som står diagonalt overfor hverandre.
5. Koble til vakum, og stram skruene skikkelig. Dersom skruene ikke er strammet kan det lekke væske mellom brønnene.
6. Skru ventilen slik at den er åpen for luft, og fukt alle brønnene med 100 µl TBS til alle brønnene. Prosessen går raskere ved bruk av 8-kanals pipette. Gjenfukting av membranen er viktig for å få gode resultater.
7. Fjern forsiktig bufferen fra brønnene med vakum. Følg med på alle brønnene og skru av vakumet straks når all bufferen er borte.

Hints: Ikke la membranen tørke ved bruk av vakum.

Fjern luftbobler fra brønnene etter at prøver er tilsatt

BIO RAD: Bio-Dot Instruction Manual, Section 4; Protein Blotting

8. Sett på antigen/prøve i minst mulig volum (15 µl) og la det renne igjennom kun ved gravitasjon. Slangen til apparatet bør ligge lavere enn selve apparatet slik at dette lettere lar seg gjøre, sett derfor apparatet på et stativ. Det tar ca 30 min før prøvene har trukket igjennom.
9. Tilsett 200ml med Tween-Tris buffered saline (TTBS) til hver brønn. Sett på vakuumet og trekk vaskeløsningen forsiktig igjennom. Fjern vakuumet straks det har trukket igjennom. Gjenta vasketrinnet.
10. Skru av lokket på apparatet mens vakuumet fremdeles står på. Fjern så membranen.

WESTERN: DETEKSJON AV IMMUNOBLOTT

11. Blokk membranen i Blotto i 60 min ved romtemperatur og vipping.
12. Hell av blokkerløsningen
13. Tilsett Primært antistoff, 10ml/membran. Inkuberes 1 time ved romtemperatur med vipping. Kan også inkuberes over natt i kjølerom med vipping.
14. Ta vare på primært antistoff. Holdbart i kjøleskap i noen dager eller frys ned.
15. Vask 3x10 min med blotto ved romtemperatur med vipping.
16. Tilsett sekundært antistoff, 10ml/membran. Inkuberes i 45-60 min. ved romtemperatur med vipping.
17. Kast sekundært antistoff.
18. Vask 3x10min i blotto ved romtemperatur med vipping.
19. Skyll membranen 2 ganger med T-TBS.
20. Vask membranen 2 x10 min. med T-TBS ved romtemperatur og med vipping.

## PASIENTTABELLER MED ESTIMATER FOR CYP3A4

Tabellene presenterer estimater for CYP3A4 i biopsiene til hver enkelt pasient. Kvantitative mengder er angitt som gjennomsnitt og standardavvik. Standardavvik er ikke beregnet for estimater basert på 2 paralleller.

**Tabell 9:** Kvantitative data for estimert mengde CYP3A4 i pasient 11.

<b>Pasient 11</b>	<b>fmol CYP3A4/g biopsi (reløst pellet)</b>	<b>fmol CYP3A4/g biopsi (supernatant)</b>	<b>fmol CYP3A4/g biopsi (total)</b>	<b>fmol CYP3A4/mg protein</b>
Ileum	180,8 ± 23,6	52,6 ± 2,5*	233,4*	16,9*
Jejunum	124,3 ± 12,4	51,0 ± 2,6*	175,3*	28,7*
Magesekk	161,7 ± 11,5	52,6 ± 1,8*	214,3*	15,5*
Lever	88,7 ± 4,4*	48,4 ± 2,5*	137,1*	5,7*
PK3	318,3 ± 18,2	50,9 ± 2,7*	369,2*	27,7*

\* Estimert på intensiteter utenfor lineært område for standardrekken

**Tabell 10:** Kvantitative data for estimert mengde CYP3A4 i pasient 12.

<b>Pasient 12</b>	<b>fmol CYP3A4/g biopsi (reløst pellet)</b>	<b>fmol CYP3A4/g biopsi (supernatant)</b>	<b>fmol CYP3A4/g biopsi (total)</b>	<b>fmol CYP3A4/mg protein</b>
Ileum	210,3 ± 7,1	375,4 ± 2,2	585,7	38,3
Jejunum	292,8 ± 19,9	158,3 ± 1,8	451,1	29,0
Magesekk	260,2 ± 21,1	104,3 ± 3,5*	364,5*	10,7*
Lever	144,7 ± 48,0	46,7 ± 1,5*	191,4*	9,0*
PK3	488,7 ± 8,7	106,6 ± 29,8*	595,3*	78,9*

\* Estimert på intensiteter utenfor lineært område for standardrekken

**Tabell 11:** Kvantitative data for estimert mengde CYP3A4 i pasient 5.

<b>Pasient 5</b>	<b>fmol CYP3A4/g biopsi (reløst pellet)</b>	<b>fmol CYP3A4/g biopsi (supernatant)</b>	<b>fmol CYP3A4/g biopsi (total)</b>	<b>fmol CYP3A4/mg protein</b>
Ileum	289,1	30,1	319,2	23,0
Jejunum	213,7	36,2*	249,9*	9,4*
Magesekk	203,4	33,6*	237,0*	23,6*
Lever	289,5	8,0*	297,6*	15,0*
PK3	499,8	43,3*	543,1*	55,4*

\* Estimert på intensiteter utenfor lineært område for standardrekken



**Tabell 12:** Kvantitative data for estimert mengde CYP3A4 i pasient 7.

<b>Pasient 7</b>	<b>fmol CYP3A4/g biopsi (reløst pellet)</b>	<b>fmol CYP3A4/g biopsi (supernatant)</b>	<b>fmol CYP3A4/g biopsi (total)</b>	<b>fmol CYP3A4/mg protein</b>
Ileum	239,4	9,6	249,0	20,3
Jejunum	171,8	8,0*	179,8*	20,0*
Magesekk	269,1	11,2	280,3	7,2
Lever	170,7	7,1*	177,8*	17,3*
PK3	218,2	15,7	233,9	20,1

\* Estimert på intensiteter utenfor lineært område for standardrekken

**Tabell 13:** Kvantitative data for estimert mengde CYP3A4 i pasient 6.

<b>Pasient 6</b>	<b>fmol CYP3A4/g biopsi (reløst pellet)</b>	<b>fmol CYP3A4/g biopsi (supernatant)</b>	<b>fmol CYP3A4/g biopsi (total)</b>	<b>fmol CYP3A4/mg protein</b>
Ileum	83,4*	14,2*	97,6*	10,6*
Jejunum	97,4*	21,0*	118,4*	5,4*
Magesekk	148,4*	45,5*	193,9*	18,1*
Lever	27,4*	0,4*	27,8*	2,4*

\* Estimert på intensiteter utenfor lineært område for standardrekken

**Tabell 14:** Kvantitative data for estimert mengde CYP3A4 i pasient 8.

<b>Pasient 8</b>	<b>fmol CYP3A4/g biopsi (reløst pellet)</b>	<b>fmol CYP3A4/g biopsi (supernatant)</b>	<b>fmol CYP3A4/g biopsi (total)</b>	<b>fmol CYP3A4/mg protein</b>
Ileum	89,4*	20,9*	110,3*	8,3*
Jejunum	90,8*	21,3*	112,1*	11,5*
Magesekk	60,1*	5,2*	65,3*	3,3*
Lever	29,2*	0,8*	30,0*	1,3*

\* Estimert på intensiteter utenfor lineært område for standardrekken

**Tabell 15:** Kvantitative data for estimert mengde CYP3A4 i pasient 4.

<b>Pasient 4</b>	<b>fmol CYP3A4/g biopsi (reløst pellet)</b>	<b>fmol CYP3A4/g biopsi (supernatant)</b>	<b>fmol CYP3A4/g biopsi (total)</b>	<b>fmol CYP3A4/mg protein</b>
Ileum	5,0	3,2	8,2	3,7
Jejunum	31,0	2,0*	33,0*	3,6*
Magesekk	41,0*	11,2*	52,2*	10,0*
Lever	41,0*	3,4	44,4*	3,8*

\* Estimert på intensiteter utenfor lineært område for standardrekken

**Tabell 16:** Kvantitative data for estimert mengde CYP3A4 i pasient 9.

<b>Pasient 9</b>	<b>fmol CYP3A4/g biopsi (reløst pellet)</b>	<b>fmol CYP3A4/mg protein</b>
Ileum	193,2*	21,1*
Jejunum	86,8*	5,7*
Magesekk	111,7*	11,2*
Lever	224,7*	16,5*

\* Estimert på intensiteter utenfor lineært område for standardrekken

## ABSTRAKT OM OPPGAVEN

Clinical Pharmacy

**The link between intestinal expression of CYP enzymes and transporters and the bioavailability of atorvastatin**

OFTEDAHL T, SKOTTHEIM I B, SANDBU R, ÅSBERG A, CHRISTENSEN H, Department of Pharmaceutical Biosciences, School of Pharmacy, University of Oslo and the Center for Morbid Obesity Hospital in Vestfold, Tønsberg.

*E-mail:* [tone.oftedahl@gmail.com](mailto:tone.oftedahl@gmail.com)

*Postadresse:* Tone Oftedahl, Trudvangveien 35, 0363 Oslo

Atorvastatin is a lipid lowering drug prescribed for the treatment of hypercholesterolemia. The bioavailability of atorvastatin is limited by extensive CYP3A4 and CYP3A5 metabolism and atorvastatin is also a substrate for P-glycoprotein and OATP1B1 transport. This results in a low (12%) bioavailability.

The present project is part of a larger cooperative project including 36 morbidly obese patients undergoing bariatric surgery. The overall goal is to investigate the influence of bariatric surgery on the pharmacokinetics of atorvastatin. The aim of this sub study was to inquire possible correlation between expression of CYP 3A4, CYP 3A5, P-gp and OATP1B1 in biopsies sampled from the liver and at different segments of the small intestines and the systemic exposure of atorvastatin in the same patients.

The biopsies were obtained with Precellys 24 and microsomes were isolated as S9 fractions after centrifugation. The pellet was dissolved in Tris-buffer and prepared for Western blotting. An immunoassay spot-blot was performed utilizing the Bio-Dot microfiltration apparatus and a nitrocellulose membrane, and the expression of CYP3A4 and CYP3A5 was quantified using Syngene and GeneTools. Vilin, a cytoskeletal protein specific for the enterocytes, was applied to normalize the amount of enzymes in each biopsy. Plasma concentration samples for pharmacokinetic investigations were collected the day before the surgery (24 hour profile) and analyzed by a validated HPLC-MS/MS method.

In drug treatment today the dosage of drugs is often generalized and based on anatomical criteria such as weight and height. This study can elaborate the importance of how interindividual differences in expressed transporters and metabolizing enzymes, in both intestine and liver, can affect bioavailability of atorvastatin. Data on intestinal expression of the above mentioned proteins and systemic exposure data of atorvastatin will be presented at the meeting.